



Carolina Rufino de Sá e Silva

Licenciatura em Biotecnologia

Estudo da utilização do ácido hialurónico como veículo de entrega de células autólogas em substitutos de pele

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Jorge Carvalho Silva, Professor auxiliar,
FCT/UNL

Co-orientadores: Maria Angélica Almeida, Cirurgiã plástica,
Hospital de São José

Júri

Presidente: Ana Cecília Afonso Roque, Professor Auxiliar com
Agregação, FCT/UNL

Arguentes: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT/UNL

Vogais: Jorge Carvalho Silva, Professor Auxiliar, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Estudo da utilização do ácido hialurónico como veículo de entrega de células autólogas em substitutos de pele

Copyright © Carolina Rufino de Sá e Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Tudo vale a pena quando a alma não é pequena.

Fernando Pessoa

Agradecimentos

O meu percurso foi feito de altos e baixos, aliás como qualquer desafio. Mas independentemente dos momentos menos bons, tive sempre alguém do meu lado para me dar aquela palavra de apoio, carinho e motivação. E são a essas pessoas que devo o meu sincero agradecimento.

Ao meu orientador Jorge Carvalho Silva, por toda a dedicação, disponibilidade, entrega e confiança que demonstrou. Por todo o rigor que sempre esperou de mim, porque assim fez-me acreditar que é sempre possível melhorar.

À minha co-orientadora Maria Angélica Almeida pela disponibilidade e apoio ao longo deste percurso.

À toda a equipa do GREAT lab por todo o apoio incondicional, por toda a animação, amizade, diversão e espírito de entreajuda. Foi sem dúvida um laboratório cheio de alegria, que se não assim fosse, tudo se tornaria mais difícil de concretizar. Foi um ano muito especial para mim e vai-me custar imenso abandonar este ambiente, onde se criaram grandes laços de amizade. Por isso, um profundo e sincero obrigado às minha colegas e amigas, Ana Fradinho, Ana Pepe, Ana Nogueira, Susana Caixado e Tânia Vieira.

A todos os outros departamentos e laboratórios que estiveram envolvidos, CENIMAT/I3N e Departamento de Ciências dos Materiais. Agradeço toda a confiança que depositaram em mim, sem vocês este projeto não seria possível.

À minha grande e especial amiga Magda, que foi um dos meus principais alicerces neste longo percurso. Esteve sempre presente nos bons e maus momentos, apoiando-me incansavelmente. Obrigado por me fazer sorrir nos momentos mais difíceis. Obrigado por tudo e por seres quem és.

À minha amiga Catarina que esteve sempre presente e disposta a levantar-me do chão, sendo a pessoa contagiante e animada que é.

À Cindy que também esteve disposta a ajudar-me em tudo, nos bons e maus momentos. Obrigado!

Por último, o meu mais sentido agradecimento...à minha família, por todo o amor e dedicação. Um obrigado enorme e imensurável, à mulher da minha vida, à minha mãe, por me ter proporcionado a oportunidade de seguir os meus sonhos, por toda a paciência, compreensão e amor.

Resumo

As feridas cutâneas profundas, mais precisamente as queimaduras de terceiro grau, representam problemas clínicos significativos apesar dos avanços científicos e tecnológicos recentes na área da Engenharia de Tecidos. Nos casos menos graves, as queimaduras dão origem a pele fisiologicamente e esteticamente imperfeita e, nos casos mais graves, têm associadas elevadas taxas de mortalidade. É portanto, crucial desenvolver novas terapias facilmente disponíveis e económicas para evitar infeções e auxiliar na regeneração da pele.

Este trabalho enquadra-se no desenvolvimento e caracterização de um substituto de pele baseado em polímeros biodegradáveis e células autólogas. O objectivo do trabalho consistiu em avaliar a viabilidade da utilização do ácido hialurónico como veículo para o transporte e aplicação das células na ferida a tratar.

O estudo desta viabilidade (testes *in vitro*) passa pela construção de sementeiras de células fibroblásticas (da linha celular HFFF2 e de biópsias de pele) embebidas no gel de ácido hialurónico (HA) sobre as matrizes poliméricas (obtidas através da técnica de eletrofiação) individualmente e sobre uma matriz ternária avaliando assim a adesão e proliferação das células. Os polímeros utilizados foram a gelatina (GEL), a policaprolactona (PCL) e o quitosano (CS). As diferentes células aderiram e proliferaram favoravelmente nestas condições.

Foi também criado um substituto epidérmico que simulou o efeito protetor da epiderme, constituído por polivinilpirrolidona (PVP) e quitosano (CS). Esta matriz também produzida por eletrofiação, foi colocada sobre as células embebidas no HA e posteriormente analisada a viabilidade, através da sementeira de células HFFF2 e de células obtidas através de biópsias de pele. As células de diferentes origens aderiram e proliferaram a taxas superiores na matriz ternária (substituto dérmico) do que na matriz PVP/CS.

Palavras-chave: Eletrofiação, Gelatina de peixe, Policaprolactona, Quitosano, Ácido hialurónico, Substitutos dérmico e epidérmico, Fibroblastos.

Abstract

Deep wounds, especially third-degree burns, represent significant clinical problems despite scientific advances and technological developments in the field of Tissue Engineering. In less severe cases, burns lead to physiologically and aesthetically imperfect skin and, in severe cases, are associated with high mortality rates. It is therefore crucial to develop new therapies easily accessible and economic to prevent infection and aid in the regeneration of skin.

This work relates to the development and characterization of a skin substitute based on biodegradable polymers and autologous cells. The aim of the study was to evaluate the feasibility of the use of hyaluronic acid as a vehicle for the transport and application of cells to the wound to be treated.

The feasibility study (*in vitro* tests) involves seeding fibroblast cells (from the cell line HFFF2 and obtained from skin biopsies) embedded in the hyaluronic acid (HA) gel on the polymer matrices (obtained by electrospinning) individually and as a ternary matrix thus evaluating the adhesion and proliferation of cells. The polymers used were gelatin (GEL), polycaprolactone (PCL) and chitosan (CS). The different cells adhered and proliferated well in these conditions.

An epidermal substitute that simulates the protective effect of the epidermis, was also created. It is composed by polyvinylpyrrolidone (PVP) and chitosan (CS). This matrix, also produced by electrospinning, was placed over the cells embedded in HA and subsequently the viability HFFF2 cells and cells obtained from skin biopsies was analyzed. The cells of different origins adhered and proliferated at higher rates in the ternary matrix (dermal substitute) than on PVP/CS matrix.

Keywords: Electrospinning, Fish Gelatine, Polycaprolactone, Chitosan, Hyaluronic acid, Dermal and Epidermal Substitutes, Fibroblasts.

Índice Geral

<i>Tudo vale a pena quando a alma não é pequena.</i>	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice Geral	xi
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Figuras	xv
Lista de Símbolos	xxiii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xxv
Apresentação e Enquadramento do Trabalho	xxvii
1 Introdução	31
1.1 Pele	31
1.1.1 Anatomia/Estrutura e Funções	31
1.1.2 Mecanismo de cicatrização de feridas cutâneas	36
1.1.3 Patologias cutâneas	41
1.2 Engenharia de Tecidos	44
1.2.1 Desenvolvimento de substitutos de pele	45
2 Materiais e Métodos	55
2.1 Materiais	55
2.1.1 Gelatina	55
2.1.2 Quitosano	57
2.1.3 Poli (óxido de etileno)	58
2.1.4 Policaprolactona	59
2.1.5 Polivinilpirrolidona	60
2.1.6 Ácido hialurónico	61
2.2 Eletrofição	62
2.2.1 Montagem experimental	65
2.3 Caracterização das matrizes	71
2.3.1 Análise morfológica	71

2.3.2	<i>Ensaaios de tração mecânica.....</i>	72
2.3.3	<i>Ensaaios de perda de massa.....</i>	73
2.3.4	<i>SEM.....</i>	74
2.3.5	<i>ATR-FTIR.....</i>	74
2.3.6	<i>DSC/TGA.....</i>	75
2.3.7	<i>WVTR.....</i>	75
2.4	<i>Testes in vitro.....</i>	76
2.4.1	<i>Extração enzimática de células de biópsias de pele e extração de células a partir de um explante de pele.....</i>	77
2.4.2	<i>Culturas com a linha celular HFFF2 e células extraídas do explante em HA.....</i>	79
2.4.3	<i>Culturas em bicamada com a linha celular HFFF2 e células extraídas do explante em HA.....</i>	80
2.4.4	<i>Viabilidade celular.....</i>	82
2.4.5	<i>Observação do núcleo e citoesqueleto das células.....</i>	83
3	<i>Apresentação e Discussão de Resultados.....</i>	85
3.1	<i>Matrizes unitárias e ternária.....</i>	85
3.1.1	<i>Produção e caracterização.....</i>	85
3.2	<i>Testes in vitro.....</i>	95
3.2.1	<i>Cultura de células HFFF2.....</i>	95
3.3	<i>Componente epidérmica e Bicamada (componente dérmica e epidérmica).....</i>	103
3.3.1	<i>Produção e caracterização.....</i>	103
3.3.2	<i>Testes in vitro.....</i>	115
4	<i>Conclusões e Perspetivas Futuras.....</i>	121
	<i>Referências.....</i>	125
	<i>Anexos.....</i>	135

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Substitutos de pele biológicos que se encontram no mercado. Na primeira coluna encontra-se o nome e o fabricante dos substitutos, na segunda coluna encontra-se uma representação esquemática do substituto, a terceira coluna apresenta os constituintes (camadas) e as duas últimas colunas evidenciam o preço do material [26].	54
Tabela 2.1 - Polímeros (solutos) e solvente utilizados para a preparação das soluções.	67
Tabela 2.2 - Condições para o lançamento das culturas celulares em bicamada, onde se destacam as matrizes inferior (GEL/PCL/CS) e superior (GEL/PCL/CS ou PVP/CS) nos diferentes meios de cultura (DMEM ou HA).	81
Tabela 3.1 - Diâmetro médio das fibras e desvio padrão obtidos para as fibras de PCL.	86
Tabela 3.2 - Diâmetro médio das fibras bem como o desvio padrão obtidos para as fibras de GEL sem reticulação. Nas fibras de GEL com reticulação não foi possível determinar o diâmetro médio.	87
Tabela 3.3 - Diâmetro médio das fibras e desvio padrão obtidos para as fibras de CS.	89
Tabela 3.4 - Diâmetro médio das fibras e desvio padrão obtidos para as fibras de MT com e sem reticulação.	91
Tabela 3.5 - Taxas de transmissão de vapor de água das matrizes GEL/PCL/CS ($\text{g/m}^2/\text{dia}$) reticuladas com GTA a 5% durante 3,5h e não reticuladas com o intervalo [valor médio \pm incerteza] correspondente.	93
Tabela 3.6 - Módulos de Young da matriz ternária (GEL/PCL/CS), reticulada com glutaraldeído a 5% durante 3,5h, seca e hidratada com o intervalo [valor médio \pm incerteza] correspondente.	94
Tabela 3.7 - Diâmetros médios das fibras e desvios padrões (nm) das matrizes de PVP/CS sem irradiação e de PVP/CS com diferentes tempos de irradiação, nomeadamente 15, 60 e 600 minutos.	106
Tabela 3.8 - Bandas IR (cm^{-1}) obtidas através do espectro FTIR-ATR (Figura 3.15) correspondente a cada polímero usado, CS, PEO e PVP.	107
Tabela 3.9 - Resultados das médias de perda de massa (%) com o valor médio \pm incerteza para cada tempo de irradiação por luz UV (15, 30, 45 e 60 minutos).	112
Tabela 3.10 - Taxas de transmissão de vapor de água das matrizes PVP/CS irradiadas com luz UV e não irradiadas, indicando o intervalo [valor médio \pm incerteza].	113
Tabela 3.11 - Módulos de Young da matriz PVP/CS irradiada com luz UV durante 1h, seca e hidratada, indicando o intervalo [valor médio \pm incerteza].	114

Índice de Figuras

- Figura 1.1** - Representação esquemática da estrutura da pele humana, evidenciando-se a presença da multicamada (epiderme, membrana basal, derme e hipoderme) e as suas estruturas anexas (folículos capilares, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e glândulas apócrinas) (adaptado de [10])...... 31
- Figura 1.2** - Anatomia da pele, evidenciando-se as camadas da pele, nomeadamente a camada epidérmica e a camada dérmica (derme papilar e derme reticular). Destaca-se ainda a hipoderme, a camada mais interna do órgão, e ainda a membrana basal que se encontra entre as camadas epidérmica e dérmica papilar (adaptado de [9]). 35
- Figura 1.3** - Esquema apresentando as diferentes fases de cicatrização da pele, nomeadamente a hemostase, fase inflamatória, fase proliferativa, formação e maturação da cicatriz. Em cada fase encontram-se as células e fatores de crescimento envolvidos, bem como a duração de cada fase (dias). Esta representação gráfica mostra a resposta envolvida em cada fase de cicatrização em função dos dias correspondentes. ECM-Matriz extracelular; MMP-Metaloproteinases; TIMP-Inibidores tecidulares das metaloproteinases [18]. 36
- Figura 1.4** - Primeira fase de cicatrização da ferida. No momento da lesão, o tecido é lesado e as plaquetas aderem ao colagénio exposto e entre si. As plaquetas libertam fatores de coagulação, PDGF e TGF- β para se iniciar o processo de reparação (adaptado de [17]). . 37
- Figura 1.5** - Início da fase de inflamação, que ocorre durante as primeiras 24h após a lesão do tecido, destacando-se os neutrófilos que apresentam um papel crucial nesta fase de inflamação. Os neutrófilos “atacam” as células endoteliais nas paredes dos vasos à volta da ferida (marginalização), mudando, de seguida, de forma, para se moverem através das junções celulares (diapedese) e migrarem para o local da ferida (quimiotaxia) (adaptado de [17]). 39
- Figura 1.6** - Ilustração representativa da última etapa da inflamação, onde existe a intervenção dos macrófagos que secretam PDGF e TGF- β para recrutarem fibroblastos e são cruciais para terminar a fase inflamatória e se iniciar a fase proliferativa (adaptado de [17]). 39
- Figura 1.7** - Representação esquemática da fase de remodelação que é caracterizada pela síntese e degradação contínua dos componentes da matriz extracelular, tentando estabelecer um novo equilíbrio (adaptado de [17]). 41
- Figura 1.8** - Diagrama da estrutura da pele ilustrando a profundidade de queimaduras, nomeadamente queimaduras superficiais (de 1º e 2º graus) e profundas (2º e 3º graus). As queimaduras superficiais afetam a epiderme no caso de queimaduras de 1º grau e afetam a

camada germinativa da epiderme se estivermos perante uma queimadura de 2º grau. As queimaduras profundas dividem-se em queimaduras de 2º grau e 3º grau (superficial e profunda), afetando as camadas epidérmica e dérmica papilar se ocorrer uma queimadura de 2º grau, afetando até à camada dérmica papilar na presença de uma queimadura superficial de 2º grau e no caso de queimaduras de 3º grau a lesão pode chegar até ao músculo (incluindo destruição da hipoderme) [24]. 42

Figura 1.9 - Esquema representando a evolução dos vários métodos terapêuticos para tratar tecidos lesados ou órgãos doentes até à engenharia de tecidos para reparar, regenerar ou substituir tecidos ou órgãos [32]. 44

Figura 1.10 - Queimaduras faciais e respetiva imagem por laser *Doppler* com o intuito de se evidenciar a profundidade da queimadura. A- Paciente após menos de 24h da queimadura e correspondente image por laser Doppler, onde é possível visualizar uma maior profundidade e alastramento da queimadura (nesta fase não se utilizou o substituto *TransCyte®*; B-No dia 2 aplicou-se o *TransCyte®* e já foi evidente uma melhoria na queimadura; C e D – Nos dias 4 (C) e 6 (D) continuou-se a aplicar o *TransCyte®* e verificou-se um grande avanço na cicatrização da ferida, sendo possível evidenciar a profundidade da mesma, através das imagens por laser *Doppler* (adaptado de [42]). 48

Figura 1.11 - Imagens de um paciente onde é evidente uma úlcera crónica venosa na primeira consulta com uma camada de fibrina seca e necrose, sem granulação tecidular e sem epitelização (A). B –Resposta ao primeiro transplante do substituto *EpiDex®*, evidenciando-se epitelização na área metade superior da ferida, granulação tecidular vital na parte superior durante o segundo transplante em curso (oitava semana). C – Após o segundo transplante do substituto epidérmico (nona semana). D – Após 13 semanas, verificou-se uma epitelização completa da ferida (adaptado de [43]). 49

Figura 1.12 – A- Fotografia tirada a uma paciente de 22 anos de idade, com uma cicatriz com uma área de contratura despigmentada no antebraço esquerdo causada por uma queimadura proveniente de um escaldão de há 21 anos atrás. B – Remoção da superfície da ferida e cobertura da mesma através do exerto de *Alloderm®* após dermoabrasão da superfície da cicatriz. C – A área enxertada assinala uma aparência irregular de cor púrpura nos quatro meses após a cirurgia. D – Imagem obtida do paciente 45 meses após o exerto, observando-se uma superfície uniforme e pele do antebraço aparenta uma cor adequada (adaptado de [46]). 50

Figura 1.13 - A- Ferida coberta pelo substituto epidérmico *Integra®* com arames de kirschner (pinos de aço inoxidável) na ponta dos dedos para uma estabilização temporária dos ossos dos dedos. B e C- Evidência de excelente contorno e reconstrução funcional com completa

extensão da articulação metacarpofalângica. B – Baixa contratura de flexão da articulação interfalângica. C- Demonstração de uma boa oposição do dedo polegar. D e E- Fotografias do paciente obtidas após 2 anos, onde é evidente um movimento normal das articulações metacarpofalângicas e bom aperto de mão (adaptado de [47]).	51
Figura 1.14 - Após o desbridamento, o Biobrane foi aplicado na orelha do paciente e utilizando uma sutura rápida Vicryl 5-0 que permitiu imobilizar o Biobrane e proporcionar um bom contato entre as superfícies. A - Orelha direita do paciente com Biobrane bem como a aplicação do Vicryl 5-0. B – Orelha do paciente após a remoção do Biobrane, sem necessidade de aplicar mais curativos, evidenciando-se a completa cicatrização da queimadura (adaptado de [1]).	52
Figura 2.1 - Estrutura química da quitina e do quitosano. A quitina apresenta unidades repetidas de x >50% e com um grupo radical constituído por grupos acetil (grupo metil e grupo carbonilo), enquanto o quitosano apresenta unidades repetidas de y>50% e com o radical constituído por um hidrogénio [61].	57
Figura 2.2 - Estrutura química do PEO.	58
Figura 2.3 - Estrutura da unidade repetida (n) do polímero PCL [64].	59
Figura 2.4 - Estrutura química do PVP.	60
Figura 2.5 - Estrutura química do ácido hialurónico $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$.	61
Figura 2.6 - Diagrama esquemático da montagem horizontal do processo de eletrofiação, evidenciando-se os seus componentes, tais como a seringa onde se encontra a solução polimérica, a agulha que irá ejetar a solução, a bomba infusora que controla o caudal, uma fonte de alta tensão que será aplicada na agulha e um coletor que irá recolher as fibras eletrofiadas (adaptado de [72]).	62
Figura 2.7 - Montagem experimental do sistema de eletrofiação no coletor cilíndrico rotatório.	66
Figura 2.8 - Curva de tração, Tensão σ vs Extensão ϵ , onde se evidencia as fases mais importantes, nomeadamente a fase elástica, à qual corresponde à lei de Hooke, a fase plástica à qual o material adquire uma deformação permanente. É possível destacar também os limites da curva, tais como o limite elástico, o limite de resistência, que é a tensão máxima que o material suporta sem romper, e o limite de rutura corresponde à tensão em que o material rompe (adaptado de [85]).	72
Figura 2.9 - Ensaio de tração mecânica onde se visualiza a matriz a ser tracionada pelas garras da máquina.	73
Figura 2.10 - Explante de biópsia de pele humana, com a derme voltada para baixo.	79

Figura 2.11 - Representação esquemática dos poços para a construção da cultura celular, onde se visualiza a matriz polimérica (GEL/PCL/CS ou GEL ou PCL ou CS) com a sementeira de fibroblastos por cima em meio de cultura (DMEM ou HA).	80
Figura 2.12 - Representação esquemática dos poços para a construção da cultura celular em bicamada, onde se visualiza as matrizes poliméricas inferior constituída por GEL/PCL/CS e superior (GEL/PCL/CS ou PVP/CS) entre a sementeira de fibroblastos em meio de cultura.	82
Figura 3.1 - Imagem das fibras de PCL obtida por SEM com uma ampliação de 2000x (a) e histograma representativo da frequência dos diâmetros das fibras (nm) de PCL (b).	85
Figura 3.2 - Imagem das fibras de GEL não reticuladas obtida por SEM com uma ampliação de 5000x (a) e histograma representativo da frequência dos diâmetros das fibras de GEL não reticuladas (b). Imagem obtida por SEM com ampliação de 2000x das fibras de GEL reticuladas (c) não sendo possível determinar os diâmetros das fibras.	87
Figura 3.3 - Imagem das fibras de CS obtida por SEM com uma ampliação de 7500x (a) e histograma representativo da frequência dos diâmetros das fibras (nm) de CS (b).	88
Figura 3.4 - Imagem por SEM das fibras de MT sem reticulação com ampliação de 5000x (a) e o respetivo histograma, indicando a distribuição do diâmetro das fibras (b).	90
Figura 3.5 - Imagem por SEM das fibras de MT com reticulação com ampliação de 5000x (a) e o respetivo histograma, indicando a distribuição do diâmetro das fibras (b).	90
Figura 3.6 – Termograma obtido por DSC da MT sem reticulação, evidenciando-se uma temperatura de fusão correspondente ao PCL presente na amostra (60,1°C) e uma temperatura de desnaturação que corresponde à gelatina (85,8°C). Verificou-se uma perda de massa cerca de 7,5% devida à perda de água adsorvida na matriz.	92
Figura 3.7 - Termograma obtido por DSC da MT com reticulação, evidenciando-se uma temperatura de fusão correspondente ao PCL presente na amostra (60,2°C). Verificou-se uma perda de massa cerca de 7,6% devida à perda de água adsorvida na matriz.	92
Figura 3.8 - Representação gráfica evidenciando-se a população celular relativa às 24h (adesão) e 48h (proliferação) nas diferentes condições de cultura, nomeadamente células HFFF2 semeadas em HA, semeadas sob HA e controlo de células HFFF2 em DMEM. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].	96
Figura 3.9 - Representação gráfica da média dos valores de absorvância obtidos nas diferentes condições de cultura. Células HFFF2 semeadas em HA, na MT e reticulada com GTA a 5 e 50% com e sem a adição de glicina, indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].	98

- Figura 3.10** - Representação gráfica da média dos valores de absorvância obtidos nas diferentes condições de cultura. Células HFFF2 semeadas em HA, em GEL e reticulada com GTA a 5 e 50% com e sem a adição de glicina, indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza]. 98
- Figura 3.11** - Representação gráfica da população celular relativa das HFFF2 nas diferentes condições de cultura. Células semeadas em HA, nos diferentes materiais, nomeadamente na MT, GEL, PCL e CS, bem como o controlo de células, indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza]. 100
- Figura 3.12** - Imagens de microscopia de fluorescência sobrepostas (à exceção da gelatina) das células HFFF2 semeadas em DMEM nas diferentes matrizes unitárias, nomeadamente em PCL, CS e GEL, com 4 dias de cultura. Para cada matriz foram tiradas quatro imagens de fluorescência, duas para cada tempo de cultura (em que foram realizadas as leituras de absorvância) (24h e 48h) e para cada tempo foram tiradas duas, uma com uma ampliação de 100x (A) e outra com uma ampliação de 400x (B). 103
- Figura 3.13** - Imagem obtida por SEM (a) e histograma com os diâmetros obtidos (b) da matriz PVP/CS sem irradiação. 104
- Figura 3.14** - Imagem obtida por SEM (a) e histograma com os diâmetros obtidos (b) da matriz PVP/CS com 15 minutos de irradiação. 104
- Figura 3.15** - Imagem obtida por SEM (a) e histograma com os diâmetros obtidos (b) da matriz PVP/CS com 60 minutos de irradiação. 105
- Figura 3.16** - Imagem obtida por SEM (a) e histograma com os diâmetros obtidos (b) da matriz PVP/CS com 600 minutos de irradiação. 105
- Figura 3.17** - Espectros de FTIR-ATR das matrizes de PVP/CS sem irradiação e com irradiação a diferentes tempos, nomeadamente 0, 15, 60 e 600 minutos e espectros dos filmes de CS, PEO e PVP. 107
- Figura 3.18** - Termograma obtido por DSC do PVP/CS sem irradiação, evidenciando-se uma temperatura de fusão correspondente ao PEO presente na amostra (60°C). Verificou-se uma perda de massa cerca de 7,02%. 109
- Figura 3.19** - Matriz PVP/CS após 1, 2, 4, 7 e 10h de irradiação com luz UV e posterior imersão em água destilada (a). Perda de massa da matriz (%) em função dos diferentes tempos de irradiação por luz UV, após a sua hidratação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza] (b). 110
- Figura 3.20** - Matriz de PVP/CS após 15, 30, 45 e 60 min de irradiação com luz UV e posterior imersão em água destilada (a). Perda de massa da matriz (%) em função dos diferentes tempos de irradiação por luz UV, após a sua hidratação e após 3 e 5 dias de secagem na

estufa a 37°C. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza] (b).	111
Figura 3.21 - Representação gráfica da população celular relativa das células HFFF2 nas diferentes condições de cultura. Células semeadas em DMEM e HA, nos diferentes materiais, nomeadamente na MT e PVP/CS e controlo de células (em DMEM e HA), indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].....	115
Figura 3.22 - Representação gráfica da população celular relativa dos fibroblastos extraídos de biópsias de pele humana nas diferentes condições de cultura. Células semeadas em DMEM e HA, nos diferentes materiais, nomeadamente na MT e PVP/CS e controlo de células (em DMEM e HA), indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].	116
Figura 3.23 - Imagens de microscopia de fluorescência das células HFFF2 semeadas entre matrizes ternárias (GEL/PCL/CS) em DMEM. a) células aderidas à matriz inferior; b) células aderidas à matriz superior.....	118
Figura 3.24 - Imagens de microscopia de fluorescência das células HFFF2 semeadas entre matrizes ternárias (GEL/PCL/CS) em HA. a) células aderidas à matriz inferior; b) células aderidas à matriz superior.	118
Figura 3.25 - Imagens de microscopia de fluorescência das células HFFF2 semeadas em DMEM entre uma a) matriz inferior (MT) e uma b) matriz superior (PVP/CS).	118
Figura 3.26 - Imagens de microscopia de fluorescência das células HFFF2 semeadas em HA entre uma a) matriz inferior (MT) e uma b) matriz superior (PVP/CS).	119
Figura 4.1 - Termograma obtido por DSC do CS puro em filme, não se evidenciando quaisquer temperaturas de fusão, desnaturação ou de transição vítrea. Verificou-se uma perda de massa cerca de 12,3% devida à perda de água adsorvida no filme.	136
Figura 4.2 - Termograma obtido por DSC da GEL pura em filme, não se evidenciando quaisquer temperaturas de fusão, desnaturação ou de transição vítrea. Verificou-se uma perda de massa cerca de 8,4% devida à perda de água adsorvida no filme.	136
Figura 4.3 - Termograma obtido por DSC do PCL puro em filme, evidenciando-se a sua temperatura de fusão (64,2°C). Verificou-se uma perda de massa mínima, cerca de 0,58%.	136
Figura 4.4 - Termograma obtido por DSC do PEO puro em filme, evidenciando-se a sua temperatura de fusão (69,6°C). Verificou-se uma perda de massa mínima, cerca de 1,21%.	136

- Figura 4.5** - Termograma obtido por DSC do PVP puro em filme, evidenciando-se uma curva endotérmica bastante ténue perto dos 160°C, que poderá eventualmente corresponder à temperatura de transição vítrea do PVP. Verificou-se uma perda de massa mínima de cerca de 12% devida à perda de água adsorvida no filme..... 136
- Figura 4.6** - Termograma obtido por DSC do PVP/CS irradiado 15 minutos em filme, evidenciando-se a temperatura de fusão do PEO (60,0°C). Verificou-se uma perda de massa de cerca de 7,4%..... 136
- Figura 4.7** - Termograma obtido por DSC do PVP/CS irradiado 60 minutos em filme, evidenciando-se a temperatura de fusão do PEO (60,7°C). Verificou-se uma perda de massa de cerca de 7%..... 136
- Figura 4.8** - Termograma obtido por DSC do PVP/CS irradiado 600 minutos em filme, evidenciando-se a temperatura de fusão do PEO (60,8°C). Verificou-se uma perda de massa de cerca de 7,2%..... 136

Lista de Símbolos

Δl – Alongamento

A – Área

l_0 – Comprimento inicial

ε – Extensão

$D_{\text{méd}}$ – Diâmetro médio

m_f – Massa final

m_i – Massa inicial

E – Módulo de Young

σ – Tensão

Lista de Siglas e Abreviaturas

HA – Ácido hialurónico

ATR-FTIR - Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada

CEA - *Culture Epithelium Autograft* (Autoenxerto epitelial cultivado)

CC – Controlo de Células

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

DSC – *Differential Scanning Calorimetry*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas

TNF- α – Fator de necrose tumoral

TGF- β – Fator de crescimento transformador β

FDA – *Food and Drug Administration*

FBS – *Foetal Bovine Serum* (Soro fetal de bovino)

GEL – Gelatina

GAGs - Glicosaminoglicanos

GTA – Glutaraldeído

HFFF2 – *Human Caucasian Foetal Foreskin Fibroblast*

TIMP – Inibidores tecidulares das metaloproteinases

IL-1 – Interleucina -1

I – Iodo

ECM – Matriz extracelular

MT – Matriz ternária

MMP – Metaloproteinases

PMNs – Neutrófilos polimorfonucleares

PFA – Paraformaldeído

PCL – Policaprolactona

PEO – Poli (óxido de etileno)

PVP – Polivinilpirrolidona

CS – Quitosano

SEM – *Scanning Electron Microscopy* (Microscopia eletrónica de varrimento)

UV – Ultravioleta

WVTR – *Water Vapour Transmission Rate* (Taxa de transmissão de vapor de água)

PBS - *Phosphate-buffered* saline (Tampão fosfato salino)

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

Apresentação e Enquadramento do Trabalho

A Engenharia de Tecidos consiste numa ciência interdisciplinar, que envolve biologia, engenharia e ciência dos materiais. Pretende desenvolver alternativas às terapêuticas atuais, que recorrem aos transplantes de órgãos, combinando células com materiais biocompatíveis e biodegradáveis, usualmente polímeros. Esta combinação permite desenvolver construções que podem ser utilizadas para a regeneração do tecido *in vivo* e para a formação de um tecido *in vitro*.

As lesões cutâneas, mais precisamente as queimaduras, têm um particular interesse na Engenharia de Tecidos, devido à alta incidência de queimados. A mortalidade na unidade de queimados normalmente está relacionada com as infeções a que a pele fica sujeita, quando perde as funções protetoras. Este tipo de patologias pode levar à total destruição do tecido cutâneo, sendo necessário intervenção cirúrgica, tal como transplante de excertos de pele. No entanto, estas intervenções são complexas, morosas e dispendiosas. Deste modo, tende-se a encontrar alternativas, recorrendo à Engenharia de Tecidos através do desenvolvimento de produtos sintéticos ou naturais, como os substitutos de pele. Para que se desenvolva um substituto de pele ideal, este deve apresentar alguns requisitos, tais como: presença de componentes da epiderme e derme; reologia comparável à pele; custo efetivo; fácil aplicação; amplamente disponível; exibir propriedades antibacterianas e antifúngicas; taxas de evaporação da água idênticas à pele; fácil de armazenar; capacidade de suportar forças de cisalhamento, de modo a que o paciente se consiga mover adequadamente.

Existem muitos produtos no mercado que auxiliam no tratamento de queimaduras. No entanto existem poucos substitutos de pele comercializados. Para o tratamento de queimaduras de espessura superficial é normalmente utilizado o *Biobrane*®. Para o tratamento de feridas de espessura profunda moderada, são comumente utilizados o *Integra*® e o *Alloderm*®. O *Integra*® consiste numa camada interna promovendo a migração dos fibroblastos e numa camada externa com função de barreira mecânica. O *Alloderm*® traduz-se numa derme acelular sem epitélio proveniente de cadáveres, servindo como *scaffold* para os fibroblastos e queratinócitos do doente respetivamente.

Até ao momento, não há nenhum substituto de pele ideal disponível que cumpra todos requisitos acima mencionados, existindo maioritariamente a necessidade de se proceder a enxertos de pele para finalizar o tratamento. Atualmente, a engenharia de tecidos e a biotecnologia têm-se preparado no sentido de criar um substituto de pele ideal [2].

A criação dos substitutos normalmente é conseguida através de estratégias de produção de matrizes poliméricas de fibras, cujas matrizes proporcionam um ambiente propício à adesão e proliferação celular.

Entre os métodos utilizados existe a eletrofiação, que é de fácil implementação, permitindo a manipulação da matriz através da alteração dos parâmetros de processamento e composição das soluções poliméricas. Esta técnica envolve o carregamento elétrico da solução do polímero que se quer eletrofiar, para produzir as suas fibras submicrométricas. Esta solução encontra-se numa seringa de plástico com uma agulha metálica, à qual será aplicada a voltagem. Através de uma bomba infusora, é controlada a taxa de alimentação (caudal) da solução polimérica.

Para o desenvolvimento de um novo substituto de pele, deve-se ter em conta a sua eficácia e quais as consequências ou contraindicações em cada situação e paciente, pelo que, para tal, existe a necessidade de efetuar estudos *in vitro* e *in vivo*. Até à data, existem inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* que são discutidos na literatura, que apresentam resultados promissores.

O presente trabalho insere-se na sequência do projeto “Skin2: uma segunda pele bio-sintética, concebida para tratar feridas extensas” (PTDC/SAU-BMA/109886/2009). Tem como objetivo desenvolver um substituto de pele baseado em polímeros biodegradáveis e células autólogas, obtidas a partir de biópsias de pele. O projeto sugere a utilização do ácido hialurónico (um glicosaminoglicano presente na matriz extracelular da pele e que está associado à proliferação celular e à regeneração dos tecidos) como veículo para o transporte e aplicação das células na ferida a tratar.

Neste trabalho pretende-se avaliar a viabilidade da utilização do ácido hialurónico para este fim, através da sementeira de células (da linha celular HFFF2 e células obtidas de biópsias) embebidas num gel de ácido hialurónico sobre matrizes de nanofibras de diversas composições (gelatina de peixe (GEL), policaprolactona (PCL) e quitosano (CS)). As matrizes de fibras foram produzidas pela técnica de eletrofiação. Os polímeros selecionados para desenvolver o substituto dérmico tiveram por base os constituintes da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Utilizou-se a GEL por melhorar a interação entre as células e o *scaffold* e as células apresentarem uma elevada viabilidade e uma organização e morfologia normais e *in vivo* (em ratos) apresentar uma rápida epitelialização. O uso do CS deveu-se à sua semelhança estrutural aos glicosaminoglicanos, por aderir a feridas e possuir propriedades anti-microbianas. A escolha da PCL deveu-se a ser um poliéster hidrofóbico biodegradável, apresentar alta plasticidade, ductilidade e uma taxa de degradação lenta [3].

O HA foi posteriormente coberto por uma outra matriz de fibras que simula o efeito protetor da epiderme, constituída por polivinilpirrolidona (PVP), que apresenta propriedades ótimas

para manter a ferida hidratada, e quitosano (CS), pelas suas propriedades anti-microbianas. Após a produção de ambas as camadas epidérmica e dérmica, analisou-se a viabilidade e a organização celular nesta estrutura em bicamada.

Este trabalho foi realizado em parceria com a co-orientadora Dr^a Maria Angélica Almeida, cirurgiã plástica da unidade de queimados do Hospital de Santa Maria de Lisboa, que forneceu biópsias de pele humana, para posteriores testes *in vitro* com as células fibroblásticas extraídas.

A tese está organizada em 5 capítulos: enquadramento e apresentação do trabalho, introdução, materiais e métodos, apresentação e discussão dos resultados e conclusões.

O primeiro capítulo centra-se na identificação do problema, abordar os trabalhos desenvolvidos na área em que o tema da tese se insere e apresentar uma proposta de solução para o problema, descrevendo os objetivos principais do trabalho.

A introdução consiste na contextualização do projeto, descrevendo a anatomia e funções da pele, mecanismo de cicatrização de feridas cutâneas, classificação das queimaduras e tratamentos disponíveis.

O capítulo materiais e métodos centra-se no procedimento experimental, apresentando os polímeros utilizados, bem como a técnica para a produção das matrizes (eletrofiação), o plano para o desenvolvimento do substituto de pele, os métodos usados para a caracterização das matrizes e os métodos adotados para a realização dos testes *in vitro*.

O penúltimo capítulo consiste na apresentação e discussão dos resultados obtidos, com o intuito de estudar e caracterizar as componentes epiderme e derme desenvolvidas, bem como a influência do uso do ácido hialurónico como veículo de entrega de células aautólogas através de testes *in vitro*.

O último capítulo foca-se em resumir as principais conclusões dos resultados obtidos, apresentando sugestões de perspetivas futuras.

1 Introdução

1.1 Pele

1.1.1 Anatomia/Estrutura e Funções

A pele é um órgão composto por áreas anatomicamente diferentes, com uma organização complexa de constituintes celulares e estruturais. Estas áreas têm distintas funções biológicas, que estão relacionadas com uma organização macromolecular [4].

A pele é composta por epiderme e derme, com fornecimento de sangue, e por uma terceira camada, a hipoderme [5]. Sendo um órgão em multicamada e complexo, produz ainda diversas estruturas especializadas designadas por estruturas anexas (folículos capilares, unhas, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e glândulas apócrinas), que consistem em células heterogêneas e componentes extracelulares [6].

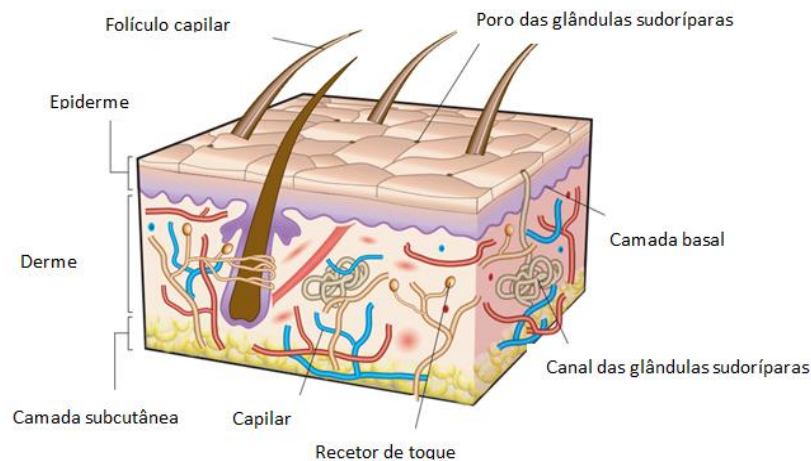


Figura 1.1 - Representação esquemática da estrutura da pele humana, evidenciando-se a presença da multicamada (epiderme, membrana basal, derme e hipoderme) e as suas estruturas anexas (folículos capilares, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e glândulas apócrinas) (adaptado de [10]).

Na figura anterior, encontra-se uma representação esquemática da estrutura da pele, destacando-se as diferentes camadas, bem como as suas estruturas anexas.

A pele forma uma interface de auto-renovação e auto-reparação entre o corpo e o ambiente. Em termos de funções que desempenha, a pele supera qualquer outro órgão [7], apresentando as seguintes funções [7], [8]:

- Proteção contra danos físicos, químicos, imunes, patogênicos, proteção contra a radiação UV e radicais livres;
- Capacidade de absorção e de excreção;
- É seletivamente permeável a certas substâncias químicas;
- Tem boas propriedades de atrito, ajudando na locomoção e manipulação pela sua textura;
- Sendo elástica, ela pode ser esticada e comprimida dentro de determinados limites;
- Principal participante na termoregulação;
- Funciona como um órgão sensorial em resposta ao toque, temperatura e dor;
- Executa funções do sistema endócrino (síntese da vitamina D, conversão periférica de pro-hormonas);
- É importante na reprodução (características sexuais secundárias, produção de feromonas).

Sendo o maior órgão no corpo, a pele cobre toda a superfície externa e forma cerca de 8% da massa corporal total, onde a sua área superficial varia de acordo com a altura e peso da pessoa. A espessura da pele varia de 1,5 a 4,0 mm, dependendo da maturidade da pele (envelhecimento) e da região do corpo [8].

- **Epiderme**

A epiderme é um epitélio estratificado e continuamente renovado e é constituída por diferentes tipos de células, que são derivadas de diferentes origens embrionárias: queratinócitos, melanócitos, células de *Langerhans* e células *Merkel* [7], [6].

A camada epidérmica é a camada mais externa, sendo altamente celular e povoada principalmente por queratinócitos. A parte inferior da camada da epiderme é constituída por melanócitos para a pigmentação [9], [5].

Esta camada é relativamente fina (0,1-0,2 mm de espessura) e firmemente ligada à derme subjacente por uma zona designada por membrana basal especializada [10].

A estrutura e funções da epiderme dependem de inúmeros processos que são iniciados durante o desenvolvimento e o ciclo de vida. A manutenção do número de células na epiderme depende do balanço entre o nascimento celular (proliferação) e a morte celular (diferenciação/apoptose) dos queratinócitos. A regulação da homeostase epidérmica depende da interação dos queratinócitos com as outras células (melanócitos, células *Langerhans* e células *Merkel*), adesão dos queratinócitos a cada célula imigrante e a interação com a derme subjacente [6].

Queratinócitos

Os queratinócitos são o tipo de células que constituem cerca de 90-95% [7] da epiderme [6].

A estrutura dos queratinócitos está relacionada com a sua posição na epiderme e o seu estado de diferenciação, contendo filamentos intermediários de queratina, tendo a queratina um papel estrutural nos queratinócitos (citoesqueleto), promovendo a integridade estrutural entre os microfilamentos e os microtubos e favorecendo também a impermeabilidade à água [6].

Para além de comporem a maior parte do epitélio, os queratinócitos sofrem queratinização, formando assim a camada superficial de pele morta [11].

Melanócitos

Os melanócitos são células responsáveis pela pigmentação da pele. Os melanócitos localizam-se na camada basal e não queratinizam. A sua principal função é a produção de melanina [11].

A melanina absorve ondas UV para evitar danos no DNA. A qualidade e quantidade de melanina presentes no corpo de um animal são determinadas pelo estado diferenciado dos melanócitos, número de melanócitos, grau de melanogénese e dendricidade, e por fatores ambientais, tais como o meio ambiente do tecido circundante, fornecimento de sangue, radiação UV e radiação ionizante [11].

Células *Langerhans*

Estas células são membros da família das células dendríticas presentes nas camadas basal e suprabasal da epiderme e no epitélio do aparelho respiratório, digestivo e urogenital. Pertencem ao sistema imunológico da pele e adquirem antígenos nos tecidos periféricos, transportan-

do-os para os nodos linfáticos e apresentando-os às células T, iniciando-se assim uma resposta imune.

Estão ainda envolvidos na imunidade antimicrobiana, hipersensibilidade de contacto, patogénese de doenças inflamatórias, entre outros [12].

Células Merkel

As células *Merkel* são células cutâneas neuroendócrinas encontradas na epiderme de vertebrados. A função neuroendócrina das células *Merkel* deve-se ao facto destas terem a capacidade de libertar péptidos neuronais. O complexo axónio-células *Merkel* atua como uma adaptação lenta do mecano-recetor, sendo possível este tipo de células detetar o tato à superfície da pele [13].

- **Membrana basal**

A membrana basal, encontrada entre as camadas epidérmica e dérmica, é uma fina camada de matriz extracelular especializada, à qual a epiderme adere. Por baixo da membrana basal encontra-se a camada dérmica e em cima situa-se a epiderme [9].

- **Derme**

A derme situada diretamente abaixo da camada basal (abaixo da epiderme), constitui grande parte da pele e é composta por colagénio com alguma elastina e glicosaminoglicanos (GAGs), designados coletivamente por matriz extracelular (ECM é composta principalmente por fibras de colagénio e outras proteínas relacionadas [9]), bem como os fibroblastos que elaboram a ECM [5], [7].

A derme varia de espessura, dependendo do seu local no corpo, e é composta principalmente por colagénio do tipo I, com inclusões dérmicas de folículos capilares e glândulas sudoríparas, que são revestidas por queratinócitos epidérmicos. A derme é bem vascularizada e também contém recetores para o toque, temperatura e dor [10].

A função primária da derme da pele humana é o fornecimento de nutrientes, desempenhando também um papel importante na biomecânica da pele [5]. Dado que a pele é sujeita a forças que causam deformações, é necessário que a derme permita deformações elásticas, causadas por menores forças, e uma elevada tensão de rutura [14], servindo também como suporte mecânico para a epiderme, uma camada celular fina com resistência mecânica muito limitada [5].

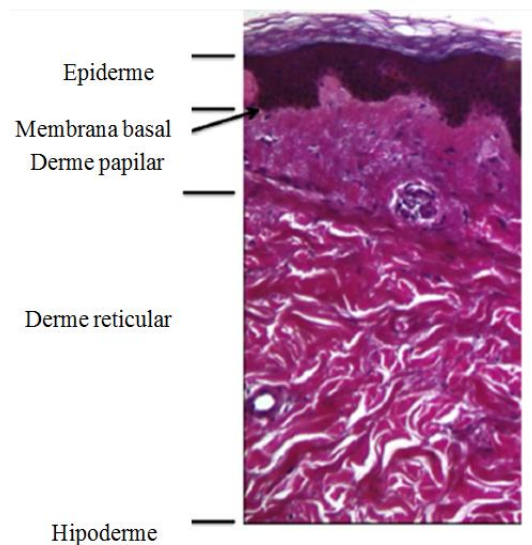


Figura 1.2 - Anatomia da pele, evidenciando-se as camadas da pele, nomeadamente a camada epidérmica e a camada dérmica (derme papilar e derme reticular). Destaca-se ainda a hipoderme, a camada mais interna do órgão, e ainda a membrana basal que se encontra entre as camadas epidérmica e dérmica papilar (adaptado de [9]).

Quanto à estrutura da derme, esta é constituída por duas regiões, a derme papilar e a derme reticular. A derme papilar compreende a camada superior da derme e é composta por fibras de colagénio finas (menos de 10 nm de diâmetro), enquanto a derme reticular é a camada inferior da derme, composta por fibras de colagénio mais espessas e mais densas (mais de 50 nm de diâmetro), formando uma rede mais flexível (Figura 1.2) [9].

A transição entre as camadas papilar e reticular não é brusca, pois as fibras de colagénio mudam de dimensão e de arquitetura de uma forma gradual [15].

Fibroblastos

Os fibroblastos são o principal tipo de células presentes na derme, sendo capazes de produzir enzimas, tais como proteases de remodelação e colagenases, as quais desempenham um papel importante no processo de cicatrização da ferida [5].

Estando envolvidas na cicatrização e contração de feridas [16], estas células do tecido conjuntivo são responsáveis pela deposição de colagénio, que é necessária para reparar os tecidos lesionados, formando a camada dérmica [17].

- **Hipoderme**

Uma terceira camada, a hipoderme, é composta principalmente por gordura (células adiposas) e uma camada de tecido conjuntivo solto. Contendo tecido adiposo, esta camada final é bem vascularizada e contribui tanto para a termoregulação como para as propriedades mecânicas da pele [5].

1.1.2 Mecanismo de cicatrização de feridas cutâneas

Uma ferida é uma rutura na integridade epitelial da pele e pode ser acompanhada por perturbação da estrutura e função do tecido normal subjacente. Portanto, é necessário envolver o mecanismo de cicatrização, de modo a reparar os danos do tecido [18]. A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo que resulta no restabelecimento da integridade do tecido danificado [19].

O processo de cicatrização de feridas envolve inúmeras células, a matriz extracelular e a ação de mediadores como os fatores de crescimento e as citocinas. O mecanismo de cicatrização deve ser dividido em quatro fases: (i) coagulação e hemostase; (ii) inflamação; (iii) proliferação e (iv) remodelação de feridas com a formação do tecido cicatricial (maturação) [20]. No entanto, alguns autores sugerem apenas 3 fases, onde a primeira etapa se enquadra no processo de inflamação [21].

Na figura seguinte (Figura 1.3) encontra-se uma representação esquemática das distintas fases de cicatrização de feridas [18]:

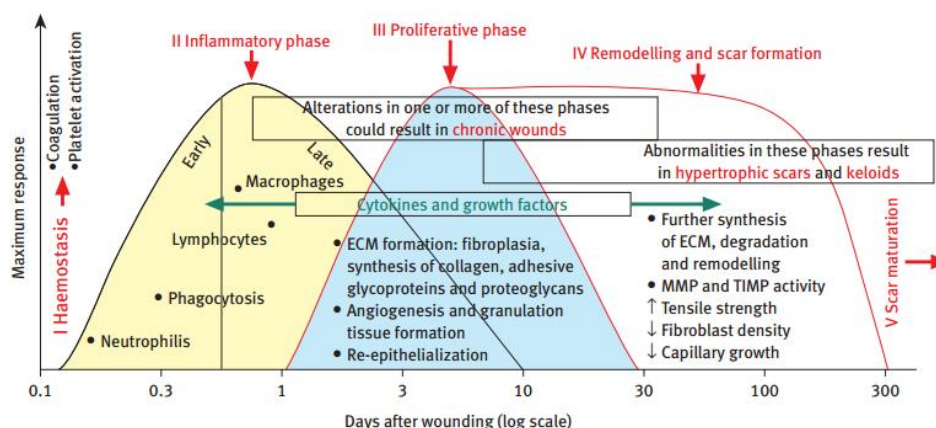


Figura 1.3 - Esquema apresentando as diferentes fases de cicatrização da pele, nomeadamente a hemostase, fase inflamatória, fase proliferativa, formação e maturação da cicatriz. Em cada fase encontram-se as células e fatores de crescimento envolvidos, bem como a duração de cada fase (dias). Esta representação gráfica mostra a resposta envolvida em cada fase de cicatrização em função dos dias correspondentes. ECM-Matriz extracelular; MMP-Metaloproteinases; TIMP-Inibidores tecidulares das metaloproteinases [18].

- **Coagulação e hemostase**

A perda da integridade estrutural do local afetado inicia a cascata de coagulação e a constrição das paredes dos vasos, levando à formação de coágulos e agregação plaquetária que previne uma maior perda de sangue [17], [18].

As plaquetas são essenciais para uma resposta inflamatória normal e aderem ao colagénio exposto e entre si mesmas, de seguida desgranulam e libertam os seus grânulos alfa que secretam vários fatores de crescimento, nomeadamente o PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) e TGF- β (fator de crescimento transformador β) que vão iniciar a cascata de cicatrização [17], [18].

O PDGF inicia a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos, células do músculo liso e fibroblastos, estimulando também a mitogénese de fibroblastos e células musculares lisas, enquanto o TGF- β estimula a secreção de citocinas adicionais, tais como o FGF (fator de crescimento de fibroblastos), PDGF, TNF- α (factor de necrose tumoral) e IL-1 (interleucina-1). Além disso, o TGF- β aumenta ainda mais a presença dos fibroblastos, a quimiotaxia de células de músculo liso e modula a expressão de colagénio [17], [18].

A imagem seguinte (Figura 1.4) representa esquematicamente esta etapa, identificando-se os diferentes organismos celulares presentes:

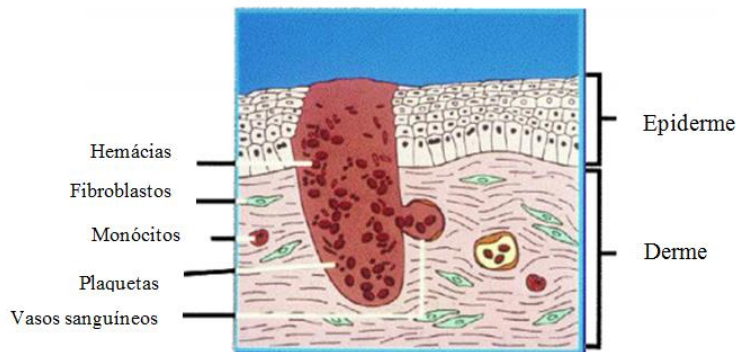


Figura 1.4 - Primeira fase de cicatrização da ferida. No momento da lesão, o tecido é lesado e as plaquetas aderem ao colagénio exposto e entre si. As plaquetas libertam fatores de coagulação, PDGF e TGF- β para se iniciar o processo de reparação (adaptado de [17]).

Nesta fase, o principal objetivo é prevenir a exsanguinação/hemorragia e consequentemente promover a hemostase. Os vasos arteriais danificados rapidamente contraem através da contração do músculo liso na camada circular da parede do vaso, mediada pelo aumento dos níveis de cálcio citoplasmáticos [19], [20]. Para além de prevenir a exsanguinação, o coágulo

proporciona uma matriz para a migração das células que são necessárias nas fases posteriores [20].

A hemostase vai promover a redução do fluxo sanguíneo mediado pela constrição das arteríolas, levando à hipoxia tecidual e acidez. Este acontecimento vai consequentemente promover a produção de óxido nítrico, adenosina e outros metabolitos que causam a vasodilatação e relaxamento da parede dos vasos arteriais. Simultaneamente, a histamina libertada pelos mastócitos vai também, por sua vez, contribuir para a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, facilitando a entrada de células inflamatórias para o local em torno da ferida. Daí, o local da ferida ficar vermelha, quente e inchada [19].

- **Inflamação**

Esta fase proporciona a prevenção da infeção da ferida [19]. O processo de inflamação pode ser dividido em fase de inflamação precoce e em fase de inflamação tardia, dependendo da duração da resposta e do tipo de células inflamatórias envolvidas.

A fase de inflamação precoce decorre durante um a dois dias, iniciando-se através da ativação da cascata complemento e pela infiltração de neutrófilos na ferida [18]. Os neutrófilos têm três mecanismos de destruição de materiais estranhos ao organismo e bactérias: a ingestão direta das partículas estranhas; a libertação de substâncias activas (lactoferrina, proteases, elastase de neutrófilos e catepsina) que destruirão as bactérias, bem como o tecido hospedeiro morto [17], [19]. Após os neutrófilos terem cumprido a sua tarefa, entram em apoptose e são removidos pela superfície da ferida ou são fagocitados pelos macrófagos [19].

Durante este estágio inicial de inflamação, as células basais da borda da epiderme começam a apresentar maior atividade mitótica [18]. Num intervalo de 24-48 horas, as células epiteliais, a partir de ambas as extremidades, começam a migrar e proliferar ao longo da derme, depositando componentes da membrana basal à medida que progridem [18].

Na figura seguinte (Figura 1.5) encontra-se uma representação esquemática dos processos e constituintes celulares envolvidos nesta etapa de cicatrização de feridas, nas primeiras 24h, destacando-se as funções e a relevância dos neutrófilos:

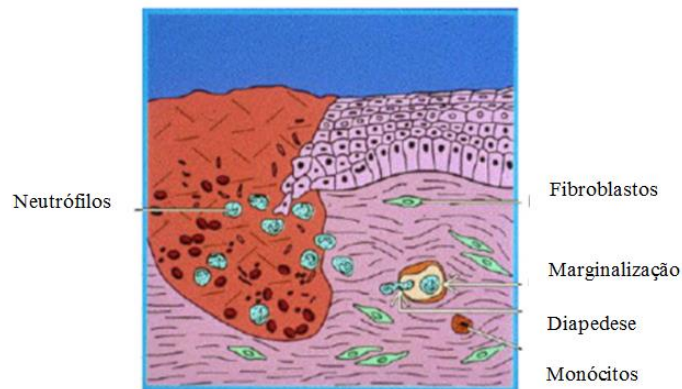


Figura 1.5 - Início da fase de inflamação, que ocorre durante as primeiras 24h após a lesão do tecido, destacando-se os neutrófilos que apresentam um papel crucial nesta fase de inflamação. Os neutrófilos “atacam” as células endoteliais nas paredes dos vasos à volta da ferida (marginalização), mudando, de seguida, de forma, para se moverem através das junções celulares (diapedese) e migrarem para o local da ferida (quimiotaxia) (adaptado de [17]).

A fase de inflamação tardia (Figura 1.6), que decorre entre 2 a 3 dias após a ferida, é principalmente caracterizada pela elevada presença de macrófagos que são atraídos pelos mensageiros químicos libertados pelas plaquetas e pelas células danificadas, onde nas 48 horas os macrófagos se tornam ativos, movendo-se para o local da ferida. Os macrófagos contêm uma elevada reserva de fatores de crescimento, tais como TGF- β e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que são imprescindíveis na regulação da resposta inflamatória, estimulando a angiogénese e favorecendo a formação do tecido de granulação, que são libertados para recrutar fibroblastos [17], [18].

A presença dos macrófagos significa que estamos perante o final da inflamação e que se aproxima a fase proliferativa [17].

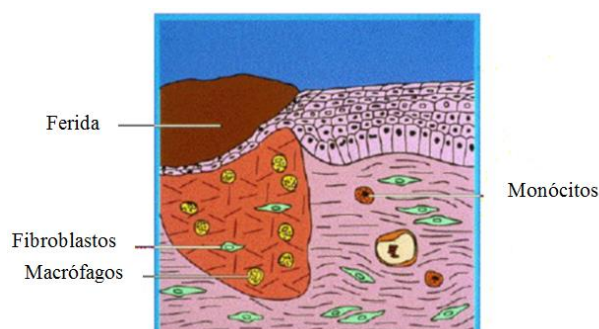


Figura 1.6 - Ilustração representativa da última etapa da inflamação, onde existe a intervenção dos macrófagos que secretam PDGF e TGF- β para recrutarem fibroblastos e são cruciais para terminar a fase inflamatória e se iniciar a fase proliferativa (adaptado de [17]).

Após as 72 horas, os fibroblastos aparecem na ferida para a produção da matriz extracelular [18].

- **Proliferação**

Na fase proliferativa, predomina a atividade celular de divisão e síntese. Os eventos que caracterizam esta fase de cicatrização são a criação de uma barreira impermeável (reepitelização), o estabelecimento de fornecimento de sangue adequado (angiogénese) e reforço do tecido dérmico danificado (fibroplasia: síntese do colagénio) [21].

Esta fase prevalece a partir do terceiro dia da ferida, estendendo-se até duas semanas [20].

A reepitelização é o processo que envolve a restauração da epiderme, através da proliferação e migração de queratinócitos epidérmicos. A sua proliferação assegura um fornecimento adequado de células para cobrir a ferida [21].

A angiogénese inicia-se a partir do momento em que o tampão hemostático se forma ao mesmo tempo em que as plaquetas libertam TGF- β , o complexo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fibroblastos (FGF) [19]. Sob condições de hipoxia, as moléculas são segregadas a partir do tecido circundante, promovendo a proliferação e crescimento das células endoteliais [20].

A fibroplasia é caracterizada pela síntese do colagénio, que permite a formação do tecido de granulação. Primeiramente ocorre a migração de fibroblastos até ao local da ferida, sendo atraídos a partir dos fatores de crescimento TGF- β e PDGF. Estando na ferida, os fibroblastos proliferam e produzem a matriz de hialuronano, fibronectina, proteoglicanos e procolagénio do tipo I e III. De seguida, os fibroblastos transformam-se em miofibroblastos, auxiliando na contração da ferida. A presença de fibronectina, proveniente da matriz extracelular vai permitir que os fibroblastos adiram à matriz e que estes forneçam um *scaffold* para as fibras de colagénio e mediar a contração da ferida (sete dias após a lesão) [20].

- **Maturação**

Esta etapa, também conhecida por remodelação, é o último evento do mecanismo de cicatrização de feridas e consiste na deposição da matriz extracelular, ou seja, de um novo epitélio e formação de uma cicatriz. Esta fase pode durar até dois anos ou mais, em caso de uma ferida crónica [17]–[20].

Esta fase (Figura 1.7) envolve um equilíbrio entre a síntese e degradação, conforme o colagénio e outras proteínas depositadas na ferida se tornem cada vez mais organizados. Eventua-

almente eles irão recuperar uma estrutura semelhante ao tecido não danificado (substituindo o colagénio III por colagénio I) [19].

Juntamente com a maturação da matriz extracelular, as fibras de colagénio aumentam de diâmetro e o ácido hialurónico e fibronectina são degradados. À medida que o colagénio III é degradado, o colagénio I é produzido pelos fibroblastos. No entanto, estas fibras de colagénio não irão recuperar a resistência original da pele não lesionada, atingindo no máximo 80% do valor inicial. A degradação do colagénio é conseguida por metaloproteinasas específicas que são produzidas pelos fibroblastos, neutrófilos e macrófagos presentes na ferida [17]–[20].

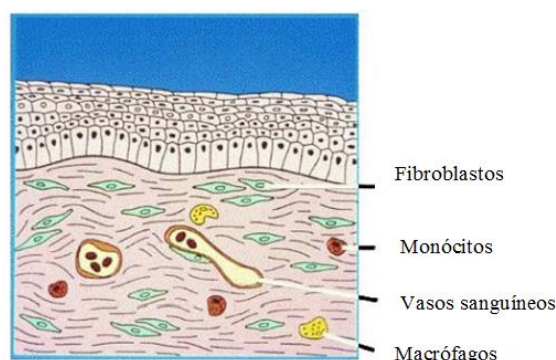


Figura 1.7 - Representação esquemática da fase de remodelação que é caracterizada pela síntese e degradação contínua dos componentes da matriz extracelular, tentando estabelecer um novo equilíbrio (adaptado de [17]).

1.1.3 Patologias cutâneas

A pele normal e a lesionada distinguem-se através de diferenças na estrutura e na função da mesma. Esta diferença é reconhecida, primeiramente, em termos de espessura da pele, composição e densidade das estruturas anexas, e em alguns casos, por diferenciação bioquímica [6].

1.1.3.1 Queimaduras

Apesar dos avanços face às queimaduras, as taxas de mortalidade destas lesões continuam a ser elevadas e portanto, existem a necessidade de encontrar medidas facilmente disponíveis e económicas, de modo a controlar a infecção da queimadura [22].

Dados recolhidos de vários países do mundo têm mostrado que a pobreza e a baixa escolaridade estão correlacionados com queimaduras mais graves. Em estatísticas globais, cerca de 90% da mortalidade causada por queimaduras ocorre em países em desenvolvimento, que continuam a ter uma alta taxa de mortalidade devido à falta de cuidados pré-hospitalares e cuidados hospitalares adequados, menor acesso a tratamentos caros, a falta de substitutos de pele, e ausência ou não funcionalidade de bancos de tecidos [23].

Para melhor compreensão dos diferentes tipos de queimaduras, nomeadamente superficiais e profundas, e quais os tecidos lesionados por cada queimadura, eis o diagrama seguinte (Figura 1.8) [24]:

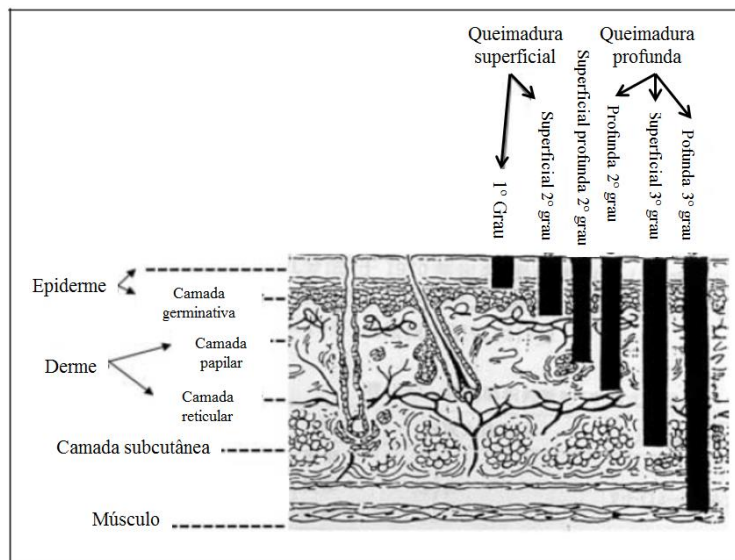


Figura 1.8 - Diagrama da estrutura da pele ilustrando a profundidade de queimaduras, nomeadamente queimaduras superficiais (de 1º e 2º graus) e profundas (2º e 3º graus). As queimaduras superficiais afetam a epiderme no caso de queimaduras de 1º grau e afetam a camada germinativa da epiderme se estivermos perante uma queimadura de 2º grau. As queimaduras profundas dividem-se em queimaduras de 2º grau e 3º grau (superficial e profunda), afetando as camadas epidérmica e dérmica papilar se ocorrer uma queimadura de 2º grau, afetando até à camada dérmica papilar na presença de uma queimadura superficial de 2º grau e no caso de queimaduras de 3º grau a lesão pode chegar até ao músculo (incluindo destruição da hipoderme) [24].

De acordo com as camadas da pele danificada, as queimaduras podem ser divididas em epidérmicas (1º grau), superficiais de espessura parcial (2º grau superficial), profundas de espessura parcial (2º grau profunda) e feridas de espessura total (3º grau). Feridas de espessura total também incluem a destruição da hipoderme. As abordagens de tratamento diferem de acordo com a espessura das camadas da pele danificada [25].

As lesões da epiderme, tais como queimaduras solares, não necessitam de tratamento cirúrgico específico e regeneram sem deixar cicatrizes. As queimaduras superficiais de espessura parcial curam-se por epiteliação, através de margens da ferida, onde os queratinócitos basais se transformam em células migratórias proliferativas. As células epiteliais migram quer a partir da borda da ferida, folículo piloso, quer a partir de glândulas sudoríparas remanescentes [25].

As feridas profundas de espessura parcial levam mais tempo de cicatrização e as cicatrizes são mais pronunciadas.

- **Tratamento de queimaduras**

O desejo de desenvolver protocolos que reduzam a mortalidade e o interesse em melhorar a qualidade anatômica e funcional da pele resultante da cicatrização de feridas, conduziu ao desenvolvimento de novos substitutos de pele e protocolos de tratamento [26].

Os primeiros passos a ter em conta consistem em excisar o tecido lesionado seguida da estabilização do paciente, sendo crucial para o avanço do tratamento [27]. A maioria das lesões cutâneas necessita de imediata cobertura da ferida de modo a reparar e regenerar a função normal da pele. No entanto, algumas das lesões são eventos traumáticos cuja reparação completa, aos níveis estrutural e funcional do tecido original, nem sempre é possível [27].

Até à data, a primeira escolha para o tratamento de queimaduras profundas e feridas de espessura total ainda é o transplante de enxertos autólogos de pele [25]. O enxerto de pele tem sido a forma mais comum de cicatrização da pele, em que as lesões são causadas por queimaduras ou outros ferimentos. A contratatura, que vem após o procedimento cirúrgico, pode comprometer a correta função do órgão e, entre os pacientes com queimaduras que receberam enxertos de pele, mais de 30% sofrem de cicatrizes hipertróficas ou contraturas [28].

Entre inúmeros produtos utilizados no tratamento de feridas e queimaduras, existem curativos passivos, tais como gases, hidrogéis, espumas, hidrocolóides (carboximetil-celulose), alginato, colagénio, celulose, filmes transparentes (poliuretano), que são recomendados para queimaduras e feridas devido à sua influência na resposta celular. Estes curativos mantêm uma ótima humidade no local, previnem e mantêm sob controlo os biofilmes microbianos, limpam os tecidos lesados, minimizam/eliminam a dor, removem os espaços mortos e os tecidos não viáveis e controlam os odores [29].

Para além dos passivos, existem ainda os curativos ativos, que são impregnados com antimicrobianos (produtos tópicos antibióticos e antifúngicos) e agentes enzimáticos de desbridamento. Os mais comumente utilizados como antimicrobianos e na prevenção da infeção da ferida (principalmente em feridas crónicas) são a sulfadiazina de prata, azul de metileno, violeta cristal e mel [29].

No entanto, as queimaduras profundas carecem de etapas adicionais de modo a possibilitar a correta regeneração da epiderme e reparação da derme do tecido, que têm revolucionado o avanço da engenharia de tecidos nos últimos anos, nomeadamente o desenvolvimento de substitutos de pele (baseados em polímeros) de origem natural ou sintética. Devido à sua estrutura porosa aberta e à boa resistência mecânica, estes polímeros permitem um microambiente ideal para a proliferação celular, migração e diferenciação. Além disso, para a regeneração completa de tecidos lesados, estes suportes poliméricos naturais ou sintéticos podem ser manipulados superficialmente para fornecer uma matriz extracelular (ECM) biocompatível [29].

1.2 Engenharia de Tecidos

O termo engenharia de tecidos apareceu no final dos anos 80, quando surgiram novas abordagens para a criação de substitutos de tecidos vivos para terapia humana [30].

Em 1988, a engenharia de tecidos foi definida como a aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental da estrutura de tecidos normais e patológicos de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido [31].

Esta área tem sido estudada e aplicada em vários órgãos com o potencial de diminuir a necessidade de transplante de órgãos [31] [32]. A engenharia de tecidos tem como ingredientes os biomateriais, as células e os reguladores do metabolismo celular. A abordagem clássica da engenharia de tecidos consiste na sementeira de *scaffolds* (estruturas 3D porosas) biodegradáveis com células e/ou a aplicação de fatores de crescimento seguida da cultura e implante para induzir e dirigir o crescimento do novo tecido saudável (Figura 1.9) [33], [34].

Até à data, clinicamente, as aplicações bem sucedidas incluem a pele, cartilagens e substituição óssea. No entanto, existem pesquisas experimentais intensivas com fins reconstrutivos, tais como os nervos periféricos, o tecido adiposo, o músculo, tecido conjuntivo (tendões, parede abdominal), cartilagem, osso, articulações, entre outros [33], [34].

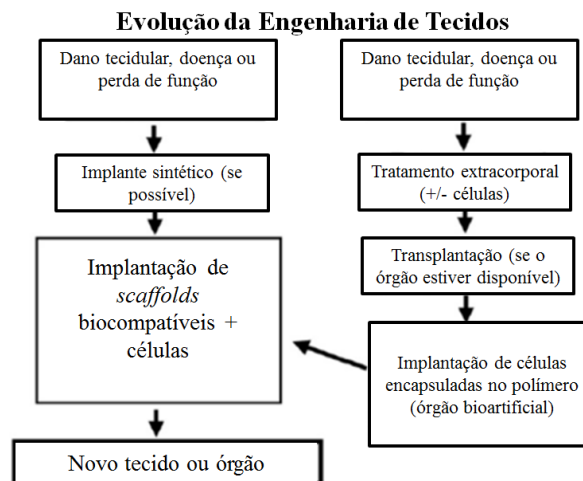


Figura 1.9 - Esquema representando a evolução dos vários métodos terapêuticos para tratar tecidos lesados ou órgãos doentes até à engenharia de tecidos para reparar, regenerar ou substituir tecidos ou órgãos [32].

Apesar das mais variadas vantagens da engenharia de tecidos, esta área ainda enfrenta alguns contratempos no que toca ao microambiente ideal para os mais variados tecidos, o que

significa que não existe uma abordagem única para resolver todas as patologias e lesões. Este problema deve-se ao facto de cada tecido e cada condição patológica exigir abordagens e condições específicas/diferentes para se obter os melhores resultados. No entanto, é difícil definir e controlar o microambiente dentro de cada tecido. Estas condições incluem fatores como a concentração de oxigénio, gradiente de citocinas, pH, potencial elétrico e iónico, nutrientes disponíveis e forças mecânicas, que se encontram num estado de equilíbrio dinâmico e que são exclusivos para cada tecido ou órgão [35].

Contudo, a engenharia de tecidos irá certamente revolucionar a próxima geração de implantes médicos, e assim oferecer esperança para milhões de pacientes que têm doenças, cujos tratamentos existentes são inadequados ou em muitos casos não existem [36].

1.2.1 Desenvolvimento de substitutos de pele

As feridas complexas são caracterizadas pela perda completa da cobertura cutânea, o que aumenta o risco de infeção, perda de água e hipotermia, o que aumenta a morbilidade, o custo e tempo de hospitalização e, em alguns casos, pode resultar em morte [37].

A técnica de cirurgia plástica mais comum para o tratamento destas feridas é o enxerto de pele autóloga. No entanto, a quantidade de material disponível, a partir de áreas dadoras, é muitas vezes limitada [37]. Daí ser crucial encontrar um substituto de pele ideal que irá fornecer uma substituição imediata da derme e epiderme perdidos, com uma cobertura permanente da ferida [2], [37], através do desenvolvimento de produtos sintéticos ou naturais, como os substitutos de pele [37].

Substitutos de pele são grupos heterogéneos de materiais de cobertura para feridas que auxiliam no encerramento e na contração da ferida e substituem as funções da pele, temporária ou permanentemente, dependendo das características do produto. Estas substâncias são alternativas para a cobertura da ferida padrão em circunstâncias em que terapias convencionais não são desejáveis [2].

Há vários fatores importantes que são levados em consideração na decisão de utilizar os substitutos de pele em queimaduras e feridas. Estes incluem a profundidade da queimadura, disponibilidade da área dadora, a probabilidade de infeção da ferida, locais da queimadura, a probabilidade de contração, resultado estético, custo relativo, o consumo de tempo e experiência dos cirurgiões [2].

Como vantagens, os substitutos de pele fornecem uma solução de cobertura rápida da ferida que pode necessitar de um leito da ferida menos vascularizado, podendo aumentar o componente dérmico da ferida cicatrizada, reduzir ou remover os fatores inibitórios da cicatrização de feridas, e reduzir a resposta inflamatória e cicatrizes subsequentes [2].

No entanto, estes substitutos de pele geralmente acarretam um maior custo, conhecimento e experiência. Por estas razões, os cientistas têm trabalhado intensamente para encontrar o substituto de pele ideal para substituir ou reparar defeitos da pele [2], [33].

Para que se desenvolva um substituto de pele ideal, este deve apresentar as seguintes características [2], [37]:

- Presença de componentes da epiderme e derme;
- Reologia comparável à pele;
- Adequação resistência/eficácia;
- Capacidade de resistência à infecção;
- Capacidade de prevenir a perda de água;
- Tolerância a hipóxia;
- Capacidade de suportar as forças de cisalhamento;
- Custo efetivo;
- Amplamente disponível;
- Longa vida útil e fácil de armazenar;
- Ausência de antigenicidade;
- Duradouro com estabilidade da ferida a longo prazo;
- Poder ser conformado a superfícies da ferida irregulares;
- Fácil de ser protegido e aplicado.

Até ao momento, não há nenhum substituto de pele ideal disponível que cumpra todos os requisitos acima mencionados. Atualmente, a engenharia de tecidos e biotecnologia têm-se preparado no sentido de criar um substituto de pele ideal [2].

Os substitutos de pele podem ser substitutos dérmicos ou epidérmicos e, para o desenvolvimento destes substitutos, deve-se ter em conta a eficácia dos mesmos e quais as consequências ou contraindicações em cada situação e paciente, pelo que, para tal, existe a necessidade de efetuar estudos *in vitro* e *in vivo* [2].

Relativamente à classificação dos substitutos de pele, estes podem ter origem natural ou sintética, dividindo os substitutos de pele em classe I, classe II e classe III [27], [38]:

Classe I

Esta classe representa os materiais de revestimento temporários, onde funcionam como uma barreira epidérmica e barreira mecânica contra bactérias e evitam a perda de água. Nesta classe, estão incluídos materiais de camada simples, onde se encontram comercializados produtos biológicos (membrana amniótica), e produtos sintéticos (*Opsite*®, *Hydrofilm*®, *Tegaderm*®, entre outros) e materiais de camada dupla produzidos através de engenharia de tecidos, encontrando-se no mercado o produto semi-impermeável *TransCyte*® [27], [38].

- Casos de estudo - *TransCyte*®

No caso do *TransCyte*®, este conseguiu a aprovação da FDA, em 1997, como cobertura de queimaduras superficiais a queimaduras totais [39], [40]. Consistindo num substituto temporário da pele, semelhante ao *Biobrane*®, composto por um *scaffold* de nylon e colagénio revestido por silicone que é semeada com fibroblastos neonatais (Tabela 1.1). Os fibroblastos são capazes de proliferar e sintetizar fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular como a fibronectina, colagénio e proteoglicanos dentro da matriz [39].

O *TransCyte*® demonstrou-se facilmente removido e tão efetivo como um aloenxerto, aquando de um estudo controlado de 66 pacientes com 132 queimaduras excisadas (Figura 1.10). As queimaduras tratadas com este substituto temporário requerem uma menor percentagem de autoexertos de pele de espessura parcial, quando comparadas com a terapia padrão de pomadas antimicrobianas [41].

Para além disto, este substituto revelou-se mais efectivo quando comparado com o substituto *Biobrane*® e com a pomada Silvazina (sulfadiazina de prata e 0,2% clorexidina), devendo-se ao fato da re-epitilização ser mais rápida, sendo sete dias e meio para o *TransCyte*®, nove dias e meio para o *Biobrane*®, e onze dias aproximadamente para a Silvazina e pela menor percentagem de necessidade de autoexerto (5% para o *TransCyte*®; 17% para o *Biobrane*®; 24% para a Silvazina), através de um ensaio clínico utilizando 33 pacientes com 58 feridas [42].

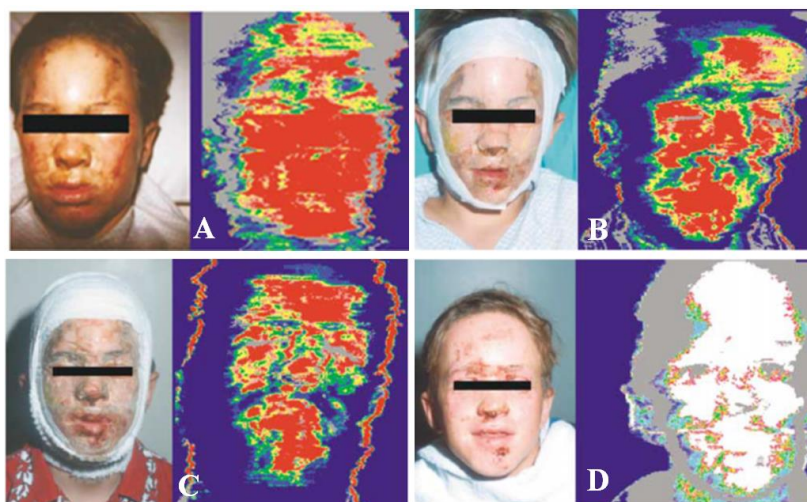


Figura 1.10 - Queimaduras faciais e respetiva imagem por laser *Doppler* com o intuito de se evidenciar a profundidade da queimadura. A- Paciente após menos de 24h da queimadura e correspondente image por laser *Doppler*, onde é possível visualizar uma maior profundidade e alastramento da queimadura (nesta fase não se utilizou o substituto *TransCyte*®); B-No dia 2 aplicou-se o *TransCyte*® e já foi evidente uma melhoria na queimadura; C e D – Nos dias 4 (C) e 6 (D) continuou-se a aplicar o *TransCyte*® e verificou-se um grande avanço na cicatrização da ferida, sendo possível evidenciar a profundidade da mesma, através das imagens por laser *Doppler* (adaptado de [42]).

Classe II

A classe II engloba os substitutos de pele de camada dupla duradouros, onde são diferenciados os substitutos epidérmicos e os substitutos dérmicos. O substituto epidérmico mais utilizado no tratamento de feridas cutâneas é o *EpiDex*®, que é gerado pela cultura de queratinócitos autólogos, através de folículos pilosos do couro cabeludo, enquanto os substitutos dérmicos mais comercializados são o *Kollagen*® e o *Alloderm*® [27], [38].

- Casos de estudo - *EpiDex*®

O *EpiDex*® consiste numa prévia cultura (7-10 dias) de queratinócitos e 14 a 18 dias de cultura para fazer crescer discos epidérmicos organotípicos de 1 cm de diâmetro para o enxerto. Este substituto foi aprovado em 2004, em que 68 pacientes foram tratados com este produto, entre 2004 e 2008, onde se demonstrou que cerca de 74% dos pacientes obtiveram cicatrização completa das úlceras, apesar da ocorrência de alguns efeitos secundários, tais como infeção da ferida (22% da amostragem) (Figura 1.11) [43].



Figura 1.11 - Imagens de um paciente onde é evidente uma úlcera crônica venosa na primeira consulta com uma camada de fibrina seca e necrose, sem granulação tecidual e sem epiteliação (A). B –Resposta ao primeiro transplante do substituto EpiDex®, evidenciando-se epiteliação na área metade superior da ferida, granulação tecidual vital na parte superior durante o segundo transplante em curso (oitava semana). C – Após o segundo transplante do substituto epidérmico (nona semana). D – Após 13 semanas, verificou-se uma epiteliação completa da ferida (adaptado de [43]).

- Casos de estudo - *Alloderm*®

No caso do substituto dérmico *Alloderm*®, este consiste em componentes orgânicos da derme sem componentes celulares antigénicos e serve como *scaffold* para fibroblastos e queratinócitos do hospedeiro [44], em suma, consiste numa derme acelular sem epitélio proveniente de cadáveres (Tabela 1.1) [39]. O *Alloderm*® é usado em feridas profundas de espessura parcial e total, facilitando o subsequente enxerto autólogo de pele de espessura parcial [39].

Existem inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* deste produto, destacando-se alguns, nomeadamente a pesquisa elaborada por Yim et al., [45] onde se utilizou uma amostragem de 64 pacientes sujeitos à aplicação do substituto (juntamente com CEA (autoenxerto epitelial cultivado) para aumentar a taxa de absorção), onde foi evidente que, aquando do uso do mesmo, 43,6% dos pacientes não apresentaram limitações dos movimentos articulares, sendo a restante percentagem devido à presença da cicatriz que impossibilita a mobilidade a 100%. No entanto, constatou-se ainda que nos pacientes que foram submetidos ao substituto, a espessura da cicatriz foi significativamente menor (1.8 ± 0.7 mm), quando comparada com pacientes sem o tratamento (2.5 ± 0.9 mm), podendo-se concluir que o *Alloderm*® apresenta efeitos positivos na redução da formação de cicatrizes.

Para além da equipa mencionada anteriormente, Oh & Kim [46] num estudo reportado em 2011 com 27 pacientes tratados com o substituto dérmico, constataram também que a contractura da cicatriz é uma das principais sequelas a longo prazo em casos de queimaduras de espessura total ou parcial, especialmente em áreas de articulações. Outra desvantagem apresentada pelos autores anteriormente mencionados foi a despigmentação da zona afetada que era

predominante nos pacientes após cirurgia, mas que foi melhorando gradualmente com o decorrer dos anos (Figura 1.12).



Figura 1.12 – A- Fotografia tirada a uma paciente de 22 anos de idade, com uma cicatriz com uma área de contratura despigmentada no antebraço esquerdo causada por uma queimadura proveniente de um escaldão de há 21 anos atrás. B – Remoção da superfície da ferida e cobertura da mesma através do exerto de Alloderm® após dermoabrasão da superfície da cicatriz. C – A área enxertada assinala uma aparência irregular de cor púrpura nos quatro meses após a cirurgia. D – Imagem obtida do paciente 45 meses após o exerto, observando-se uma superfície uniforme e pele do antebraço aparenta uma cor adequada (adaptado de [46]).

O *Alloderm*®, para além de ser utilizado como substituto dérmico, é ainda usado como substituto de tecidos moles, como cobertura de próteses implantáveis, para reparação da parede pélvica e abdominal, aumento labial, em laringoplastia e reparação vaginal [39].

Classe III

Esta classe inclui os substitutos de pele compósitos, destacando-se os substitutos de pele humana, utilizando-se enxertos de pele alogénicos e os substitutos de pele que são produzidos através da engenharia de tecidos, onde se enquadram diversos produtos: *Integra*®, que é um substituto permanente sintético feito de uma camada dérmica semelhante à derme, promovendo o crescimento celular e ajudando na formação de novos vasos sanguíneos; *Biobrane*®, que é um substituto sintético e usado principalmente para o encerramento/contração de queimaduras superficiais e feridas excisadas [27], [38].

- Casos de estudo - *Integra*®

A camada interna do *Integra*® é formada por uma matriz de colagénio de bovino e condroitina-6-sulfato, que fornece uma estrutura biodegradável, promovendo a migração de fi-

broblastos e células endoteliais para formar uma neoderme. A camada exterior é uma membrana de silicone que protege a nova matriz celular, simulando a função fisiológica da epiderme. Particularmente, ela age como uma barreira mecânica para a invasão bacteriana. Este substituto de pele apresenta inúmeros benefícios, nomeadamente flexibilidade, elasticidade e ausência de hipertrofia cicatricial [47].

Segundo um caso de estudo elaborado [47], um paciente que apresentou 20% de queimaduras em área de superfície total do corpo, com 6% de queimaduras de espessura total nas mãos e antebraços. O paciente recebeu este substituto e após 4 semanas da sua aplicação, a sua neoderme já se encontrava bem vascularizada. A camada de silicone foi removida cuidadosamente e um autoexerto de pele fina foi aplicada na neoderme. A cicatrização foi bem sucedida após 10 dias e após um mês o paciente recebeu alta continuando a fazer reabilitação com terapia de movimentos ativos e passivos durante 6 meses. Concluíram que houve uma maior melhoria nas áreas onde se aplicou o *Integra®*, comparativamente às áreas que foram tratadas apenas com autoexertos e obteve-se um bom resultado estético e funcional da mão do paciente (Figura 1.13).



Figura 1.13 - A- Ferida coberta pelo substituto epidérmico Integra® com arames de kirschner (pinos de aço inoxidável) na ponta dos dedos para uma estabilização temporária dos ossos dos dedos. B e C- Evidência de excelente contorno e reconstrução funcional com completa extensão da articulação metacarpofalângica. B – Baixa contratura de flexão da articulação interfalângica. C- Demonstração de uma boa oposição do dedo polegar. D e E- Fotografias do paciente obtidas após 2 anos, onde é evidente um movimento normal das articulações metacarpofalângicas e bom aperto de mão (adaptado de [47]).

Outro estudo interessante que apresenta resultados animadores, após a utilização deste substituto de pele, foi elaborado por Cuadra et al. [48], onde evidenciaram que cerca de 88% dos pacientes envolvidos no tratamento obtiveram uma função adequada da mão lesionada com uma recuperação completa dos movimentos articulares, boa elasticidade e resultados ideais a nível estético. Leffler, Horch, Dragu, & Bach [49], investigaram um caso de estudo interessante

onde utilizaram o *Integra*® juntamente com uma terapia de pressão negativa num paciente. Esta junção de tratamentos permitiu obter melhores resultados, melhorando a taxa de absorção e diminuição de infecções, apresentou uma estável reconstrução dos defeitos numa extensa área de pele e tecidos lesados, encurtou o tratamento cirúrgico e uma simplificação dos cuidados das feridas, tendo o tempo entre a aplicação do *Integra*® e do enxerto de pele sido encurtado. Resulta assim, num maior conforto para o paciente e numa menor permanência deste no hospital.

- Casos de estudo - *Biobrane*®:

O *Biobrane*® é um curativo biosintético composto por uma membrana de silicone fina (6 nm), flexível e semipermeável, ligada a uma camada de tecido de malha de nylon (360 nm de espessura). Esta camada de nylon é coberta por uma camada de colagénio do tipo I que fornece um revestimento hidrofílico para o crescimento da fibrina e a aderência inicial. Pequenos poros estão presentes na estrutura para permitir a drenagem de exsudados e também fornecer permeabilidade aos antibióticos tópicos [50].

Este substituto tem tido cada vez mais interesse para a cicatrização de feridas e tratamento de queimaduras de espessura superficial e de espessura profunda moderada devido ao facto de apresentarem uma taxa elevada de cura e baixos níveis de dor, quando comparado com os curativos tradicionais [1].

Num dos mais recentes casos de estudo (Figura 1.14), a orelha de um paciente foi sujeita a este substituto, apesar da sua utilização não ser popular em queimaduras faciais devido à dificuldade da sua aplicação no contorno destas áreas sensíveis. No entanto, a aplicação foi bem sucedida, de tal modo que, passada uma semana da sua aplicação, o *Biobrane*® foi facilmente removido havendo uma cicatrização completa da queimadura, pelo que se concluiu que este tratamento é viável e uma alternativa eficaz aos agentes tópicos [1].

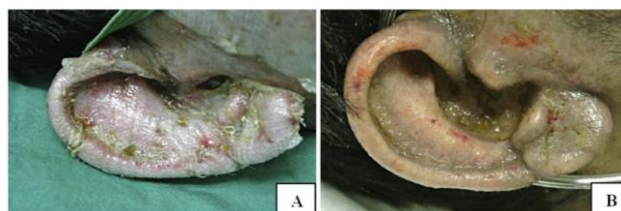


Figura 1.14 - Após o desbridamento, o Biobrane foi aplicado na orelha do paciente e utilizando uma sutura rápida Vicryl 5-0 que permitiu imobilizar o Biobrane e proporcionar um bom contato entre as superfícies. A - Orelha direita do paciente com Biobrane bem como a aplicação do Vicryl 5-0. B – Orelha do paciente após a remoção do Biobrane, sem necessidade da aplicar mais curativos, evidenciando-se a completa cicatrização da queimadura (adaptado de [1]).

Tal como o *Alloderm*®, este substituto também pode ser utilizado juntamente com CEA, tal como sugerem Frew et al., [51] quando submeteram uma criança com 80% de queimaduras de espessura total, obtendo-se melhores resultados comparativamente ao tratamento apenas com CEA.

Na Tabela 1.1 encontram-se os substitutos de pele que existem no mercado, evidenciando-se a constituição (camadas) de cada substituto e o seu preço correspondente.




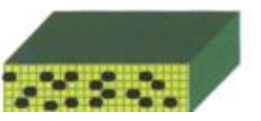



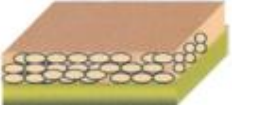
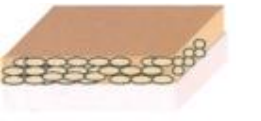
Apesar de existirem inúmeros substitutos de pele no mercado, estes não se encontram facilmente disponíveis e são bastante caros, não sendo, portanto, de fácil acesso à população mundial. Para além disto, eles devem reduzir deformidades e proporcionar um melhor resultado estético, o que significa que estes substitutos ainda não cumprem com todos os requisitos necessários para obterem o estatuto de substituto de pele ideal [2], [33], [37], [52].

A produção destes substitutos de pele pode ser realizada a partir de técnicas envolvendo a produção de matrizes poliméricas de microfibras através de processos, tais como a *electrospinning*, *wet spinning*, *gravity spinning* e *force spinning* [53].

A maior parte da engenharia de tecidos da pele é criada por expansão de células de pele no laboratório (a uma velocidade muito maior do que seria possível no paciente) e utilizá-los para restaurar a função de barreira (o objetivo primordial para pacientes queimados) ou para iniciar cicatrização de feridas (para úlceras crónicas que não cicatrizam). Outros usos incluem a aceleração da cicatrização, redução da dor em queimaduras superficiais e correção das condições em que a cura tem sido subótima (por exemplo, em cicatrizes, contraturas e defeitos pigmentares) [10], [54].

A pele necessita de ser regenerada, por isso, embora os materiais sintéticos possam ser usados temporariamente para proporcionar uma barreira, uma matriz dérmica ou um mecanismo de transferência, para uma cura a longo prazo, todos os materiais sintéticos devem ser biodegradáveis ou substituídos por células de pele humana [10], [54].

Tabela 1.1 - Substitutos de pele biológicos que se encontram no mercado. Na primeira coluna encontra-se o nome e o fabricante dos substitutos, na segunda coluna encontra-se uma representação esquemática do substituto, a terceira coluna apresenta os constituintes (camadas) e as duas últimas colunas evidenciam o preço do material [26].

Nome	Representação esquemática	Camadas	Custo	Custo por cm ²
Biobrane™ (Dow Hickam/Bertek Pharmaceuticals, Sugar Land, TX)		1. Silicone 2. Malha de nylon 3. Colágeno	5x5 cm £12.00	£0.48
Transcyte® (Advanced Tissue Sciences, Inc. La Jolla, California, USA)		1. Silicone 2. Malha de nylon 3. Colágeno semeado com fibroblastos neonatais	13x9 cm £921.15	£7.87
Apligraf® (Organogenesis Inc, Canton, MA and Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ)		1. Queratinócitos neonatais 2. Colágeno semeado com fibroblastos neonatais	7.5 cm de diâmetro do disco £626.00	£14.20
Dermagraft® (Advanced Tissue Sciences, Inc, La Jolla, California, USA)		1. Ácido poliglicólico (Dexon TM) ou Poliglactina-910 (Vicryl TM) semeados com fibroblastos neonatais	5x7.5 cm £267.80	£7.14
Integra® (Integra Life Science Corporation, Plainsboro, New Jersey)		1. Silicone 2. Colágeno ou glicosaminoglicano	10x25 cm £830.00	£3.32
Alloderm® (LifeCell, Wodlands, Texas)		1. Derme acelular epitelizada de cadáver	4x12 cm £283.00	£5.90
Epiceel™ (Genzyme tissue repair corporation, Cambrigde, MA.)		1. Cultura de queratinócitos autólogos	Ainda sem licença em UK	
Laserskin™ (Fidia Advanced Biopolymers, Italy) também no mercado como Vivoderm™ por ER Squibb & sons Inc.		1. Cultura de queratinócitos autólogos 2. Ácido hialurônico com perfurações a laser	Ainda sem licença em UK	
Cadaveric Allograft (de bancos de pele sem fins lucrativos)		1. Criopreservado para manter viabilidade 2. Liofilizado 3. Glicerolizado		£0.60

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Na Engenharia de Tecidos são usadas estruturas porosas destinadas a suportar a adesão, a proliferação e a migração celular, vulgarmente designadas por *scaffold*. Estas estruturas são habitualmente produzidas com polímeros que tanto podem ser de origem natural quanto sintética e que devem obedecer a dois critérios fundamentais: serem biocompatíveis e biodegradáveis.

Tendo em conta estudos já elaborados, foram selecionados 5 polímeros para a produção dos *scaffolds* neste trabalho. O quitosano, a gelatina de peixe e a policaprolactona integrarão uma matriz ternária que servirá de equivalente dérmico. A polivinilpirrolidona e o quitosano formarão uma camada protetora que simulará o efeito protetor da epiderme. Por fim, o ácido hialurónico servirá de veículo de entrega de células autólogas.

Os polímeros de origem sintética permitem uma maior facilidade de manipulação e controlo das propriedades físicas e químicas dos seus *scaffolds*. Os polímeros naturais são normalmente hidrofílicos e apresentam taxas de degradação elevadas o que pode requerer a utilização de estratégias de estabilização, tais como a reticulação, para que permaneçam mais tempo no local de implantação e possam assim servir de suporte às células enquanto estas sintetizam uma nova matriz extracelular (ECM) [55].

2.1.1 Gelatina

A gelatina é uma proteína solúvel obtida através da hidrólise parcial do colagénio, a principal proteína fibrosa nos ossos, cartilagens e pele. A gelatina é largamente utilizada nas mais variadas indústrias, tais como alimentar e farmacêutica, devido às suas propriedades tecnológicas e funcionais únicas [56].

As propriedades das gelatinas são influenciadas pela origem, idade do animal e o tipo de colagénio. As fontes mais abundantes de gelatina são pele de porco (46%), couro de bovino (29,4%) e ossos de bovino e porco (23,1%) e pele de peixe [57].

Até à data, cerca de 27 tipos de colagénio foram identificados, em que o tipo I é o mais comum nos tecidos conjuntivos [57]. O grau de conversão do colagénio em gelatina depende do pH, da temperatura, do processo de pré-tratamento e do processo e tempo de extração [58].

Para converter o colagénio nativo insolúvel em gelatina é necessário submetê-lo a um pré-tratamento (com ácido diluído ou alcalino) para quebrar as ligações não covalentes e para desorganizar a estrutura protéica, permitindo a clivagem das ligações intra e intermoleculares para solubilizar o colagénio [58] [56].

Dois tipos de gelatina são possíveis de obter, dependendo do procedimento do pré-tratamento, nomeadamente gelatina do tipo A e do tipo B. A gelatina do tipo A apresenta um ponto isoelétrico a um pH entre os 8 e os 9, enquanto a gelatina do tipo B com um ponto isoelétrico a um pH entre os 4 e os 5, são obtidas através de condições de pré-tratamento acídicas e alcalinas, respetivamente [57]. O tratamento ácido é mais adequado para colagénios ligados menos covalentemente, como é no caso das peles de peixe e de porco, enquanto o tratamento alcalino é mais aplicável a colagénios mais complexos encontrados, por exemplo, em couro de bovino [56].

A composição do colagénio engloba todos os 20 aminoácidos essenciais. A composição dos aminoácidos da gelatina é muito próxima da do colagénio e é caracterizada por uma sequência repetida de tripletos Gly-X-Y, onde o X é maioritariamente prolina e Y hidroxiprolina [56].

Geralmente, o colagénio presente na pele de peixe mostra uma maior variedade de composição de aminoácidos do que em mamíferos. O seu teor em hidroxiprolina e prolina é mais baixo do que em colagénios de mamíferos, sendo compensado pelo maior conteúdo em serina e treonina. O facto do colagénio de peixe apresentar menor conteúdo dos aminoácidos hidroxiprolina e prolina, pode ser a razão para a desnaturação a baixa temperatura [56], o que significa que as propriedades funcionais da gelatina são altamente influenciadas pela composição de aminoácidos e pela distribuição do peso molecular [59]. Consequentemente, o baixo conteúdo dos aminoácidos referidos anteriormente, pode limitar algumas aplicações, causando um módulo de gel baixo, baixa gelificação e baixas temperaturas de fusão [56].

Apesar da gelatina de peixe apresentar alguns inconvenientes que podem causar destabilização das suas propriedades acima referidas, a gelatina de peixe apresenta boas propriedades de formação de filmes, sendo quase transparentes, solúveis em água à temperatura ambiente e altamente extensíveis [58].

Neste trabalho, eis as razões pelas quais se escolheu a gelatina como suporte celular:

A gelatina melhora a interação entre as células e o *scaffold*, por ser obtida pela hidrólise do colagénio, que é a principal proteína estrutural da matriz extracelular da derme. As fibras de gelatina testadas *in vitro* para adesão e proliferação celular revelam uma elevada viabilidade celular e uma organização e morfologia normal e *in vivo* (em ratos) apresentam uma rápida epitelialização [3].

2.1.2 Quitosano

A quitina, o material de origem do quitosano, é um dos polímeros mais abundantes. É um importante constituinte do exoesqueleto nos animais, especialmente em crustáceos, moluscos e insetos, sendo também o principal polímero presente na parede celular de certos fungos [60].

O quitosano é um polissacárido linear composto por glucosamina e unidades de N-acetil glucosamina ligadas por ligações glicosídicas.

A conversão da quitina em quitosano é concretizada através da desacetilação do material de origem. O seu grau de desacetilação varia entre 30 e 95%, dependendo da fonte e método de produção. Quando o grau de desacetilação atinge os 50%, os grupos amina livres protonados na glucosamina torna o polissacárido solúvel em meio aquoso ácido e designa-se por quitosano (Figura 2.1). A solubilidade ocorre através da protonação do grupo $-NH_2$ na posição C2 da unidade repetida de D-glucosamina. Na forma cristalina, o quitosano é insolúvel em soluções aquosas acima de $pH=7$ [61] [62].

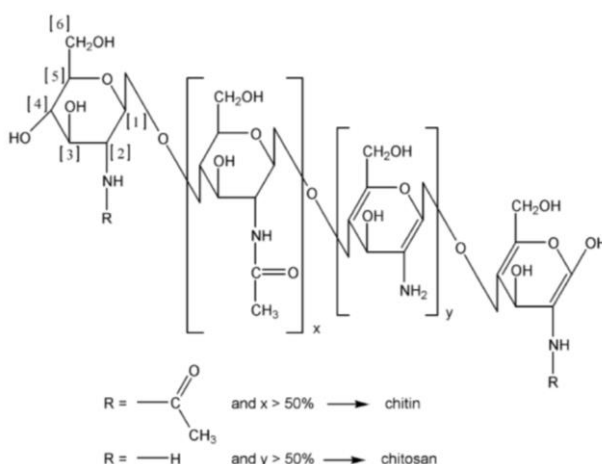


Figura 2.1 - Estrutura química da quitina e do quitosano. A quitina apresenta unidades repetidas de $x > 50\%$ e com um grupo radical constituído por grupos acetil (grupo metil e grupo carbonilo), enquanto o quitosano apresenta unidades repetidas de $y > 50\%$ e com o radical constituído por um hidrogénio [61].

O quitosano tem sido amplamente explorado para aplicações biomédicas devido às suas propriedades notáveis, tais como, biodegradabilidade, biocompatibilidade, acelerador da cicatrização da ferida, anti-inflamatória, e atividade antimicrobiana. Recentemente, as fibras de quitosano produzidas através de electrofiação têm sido consideradas como biomateriais vantajosos para cicatrização de feridas devido à indução de uma rápida regeneração tanto da epiderme como da derme *in vivo* [63].

O quitosano é considerado um polímero altamente biodegradável e facilmente excretado pela urina. Estudos revelam que quando o quitosano é inserido no organismo, este é degradado por lisozimas presentes nos tecidos e secreções tais como a saliva, lágrimas, sangue e leite. [61].

A biocompatibilidade e segurança do polímero foram revelados através de estudos envolvendo mutagenicidade, toxicidade aguda e sub aguda, hemólise e sensibilização. Estudos *in vivo* em coelhos e galinhas provaram que não existem quaisquer sintomas anormais quando se sujeitam os animais a diversas dosagens de quitina tanto por vias oral ou intravenosa. [61].

O quitosano assemelha-se estruturalmente aos glicosaminoglicanos, que se encontram presentes na matriz extracelular. Por aderir a feridas e conter propriedades anti-microbianas, o quitosano é um polímero com propriedades que favorecem o desenvolvimento de um substituto de pele. Concluiu-se ainda que o polímero ativa os macrófagos, acelerando assim o processo de cicatrização. Induz a migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) na fase *precoce* da cicatrização, favorecendo a formação de tecido de granulação e a produção de colagénio por fibroblastos. Para além disto, o quitosano apresenta um efeito positivo na re-epitelização e regeneração da pele [3].

2.1.3 Poli (óxido de etileno)

O poli(óxido de etileno) (PEO) (Figura 2.2) é um polímero de origem sintética solúvel em água. Neste trabalho o PEO foi adicionado à solução de quitosano de modo a facilitar a electrofiação deste.

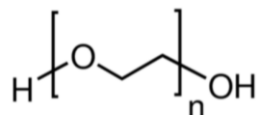


Figura 2.2 - Estrutura química do PEO.

2.1.4 Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) (Figura 2.3) é um polímero hidrofóbico e semicristalino, produzido pela abertura do anel aromático ϵ -caprolactona e consequente polimerização, usando uma variedade de catalisadores aniônicos, catiónicos e catilísadores de coordenação [54] [64].

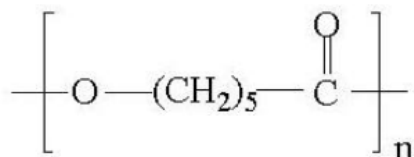


Figura 2.3 - Estrutura da unidade repetida (n) do polímero PCL [64].

O PCL é um termoplástico alifático que apresenta uma cristalinidade de 56%, um ponto de fusão entre 58 e 60°C e com uma temperatura de transição vítrea de -60°C [65].

Dentro dos mais variados polímeros biodegradáveis utilizados na engenharia de tecidos, o PCL e os seus copolímeros têm sido estudados devido à sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade [53] e propriedades mecânicas ajustáveis (módulo de Young, elasticidade, tensões de cedência e ruptura e extensão à ruptura), que são ideais para aplicações médicas e cicatrização de feridas [53].

Apesar de ser altamente biocompatível, apresenta uma taxa de degradação lenta [66], que é devida à hidrofobicidade da sua superfície, cristalinidade e massa molecular [53].

Por exemplo, segundo estudos elaborados por Hongfan Sun et al, em que analisaram a biodegradação *in vivo* de PCL em murganhos durante 3 anos, concluíram que a biodegradação segue duas etapas. A primeira envolve a diminuição do peso molecular sem deformação até 2 anos, e após 2 anos, o PCL vai perdendo resistência gradualmente, quebrando-se em pedaços. Na segunda etapa, os pedaços de PCL com baixo peso molecular são metabolizados e excretados do organismo através da urina e fezes. Para além disto, concluíram ainda que o PCL não se acumula em qualquer órgão [67].

Para além de proporcionar uma taxa de degradação lenta, o PCL apresenta uma baixa bioatividade e elevada hidrofobicidade e carga neutra [68]. Para contornar estas limitações, várias técnicas de modificações físico-químicas e pós-processamento da superfície têm sido estudadas e implementadas, nomeadamente a mistura de outros materiais com características desejadas que permitirão superar estas desvantagens do PCL, sendo o quitosano (hidrofílico, biocompatível) e o colagénio um dos exemplos utilizados para este fim [68].

Relativamente à solubilidade do PCL, este polímero é solúvel por exemplo em clorofórmio e benzeno. É semissolúvel em acetona e imiscível em inúmeros solventes, nomeadamente, em glicerol, etanol, isopropanol e água. [69].

Na engenharia de tecidos o método mais utilizado para a produção de fibras de PCL é através de electrofiação ou por fiacção por gravidade e pelo método de fiacção húmida [53].

A escolha da policaprolactona como um dos polímeros a utilizar neste trabalho passa pelo facto de ser um poliéster hidrofóbico biodegradável. Apresenta alta ductilidade e uma taxa de degradação lenta devido à hidrólise das suas ligações éster. A sua degradação começa por uma fase longa onde os grupos éster sofrem clivagem hidrolítica não enzimática e, depois surge uma rápida degradação intracelular nos fagossomas dos macrófagos e nas células gigantes. Estas duas fases de degradação ocorrem quando o peso molecular do polímero é reduzido para 3000 ou menos. Quando o polímero é aplicado em modelos *in vivo*, não induz reações inflamatórias excessivas e auxilia na cicatrização normal da ferida [3].

2.1.5 Polivinilpirrolidona

O polímero polivinilpirrolidona (Figura 2.4), também conhecido por PVP ($(C_6H_9NO)_n$), é utilizado nas mais variadas indústrias nomeadamente na área farmacêutica, sector alimentar, bebidas, cosméticos, produtos de higiene pessoal e indústria fotográfica.

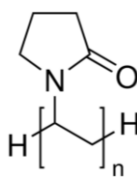


Figura 2.4 - Estrutura química do PVP.

O PVP é biocompatível, apresenta baixa toxicidade, apresenta características adesivas, estabilidade complexante, comportamento relativamente inerte e é resistente à degradação térmica.

É rapidamente preparado através da polimerização da N-vinil-2-pirrolidona.

2.1.6 Ácido hialurónico

O ácido hialurónico (HA) é um glicosaminoglicano, que se encontra no tecido extracelular em inúmeras partes do corpo, que tem sido utilizado em importantes aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e características físico-químicas particulares tais como as suas propriedades anti-inflamatórias [29], [70].

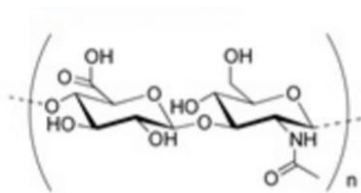


Figura 2.5 - Estrutura química do ácido hialurónico ($C_{14}H_{21}NO_{11}$)_n.

O ácido hialurónico, sendo um dos principais componentes da matriz extracelular (ECM), é crucial para a regeneração da pele, onde as suas características a nível estrutural, tais como o comprimento da cadeia, modulam a atração das células precursoras da pele e o seu potencial na engenharia de tecidos para o tratamento de feridas e queimaduras [29].

O HA foi utilizado como veículo de entrega das células. Dado que o HA se encontra naturalmente presente em todos os passos de cicatrização de feridas, o HA exógeno potencia uma cicatrização mais rápida [70].

Ele exibe uma baixa absorção não específica de proteínas e interações específicas entre o *scaffold* e as células em crescimento que podem ser adaptadas utilizando recetores celulares (CD44, RHAMM, ICAM-1) para melhorar o crescimento e reparação tecidual. Os *scaffolds* à base de HA conseguem ligar-se a proteínas e células através de recetores de superfície celular tais como o CD44, RHAMM e ICAM-1. E a expressão do RHAMM no espaço intracelular e extracelular é necessária para a locomoção celular mediada pelo *scaffold* à base de HA e, mais concretamente, em resposta à cicatrização de feridas, o recetor RHAMM ligado ao *scaffold* é regulado positivamente nos queratinócitos, macrófagos e fibroblastos migratórios para melhorar a contração da ferida e reepitelização [70].

2.2 Eletrofiação

A produção das matrizes de fibras, que servirão de suporte para a adesão e proliferação das células, foi conseguida através da técnica de eletrofiação.

A eletrofiação é uma técnica utilizada para produzir nanofibras de diferentes materiais, que permite controlar as dimensões e organização das fibras. Estas fibras poderão servir para inúmeras finalidades, nomeadamente na engenharia de tecidos, em cicatrização de feridas. Esta técnica permite-nos estudar a influência da solução polimérica e dos parâmetros de produção nas propriedades morfológicas das matrizes poliméricas obtidas [71].

O processo envolve o carregamento elétrico da solução do polímero que se quer eletrofiar, para produzir as suas fibras submicrométricas. Esta solução encontra-se numa seringa de plástico com uma agulha metálica, onde será aplicada a voltagem. Através de uma bomba, é controlada a taxa de alimentação (caudal) da solução polimérica (ml/h).

O sistema de eletrofiação necessita de uma fonte de alta tensão, uma seringa e uma agulha condutora, um coletor ligado à terra e uma bomba injetora, tal como demonstrado na Figura 2.6.

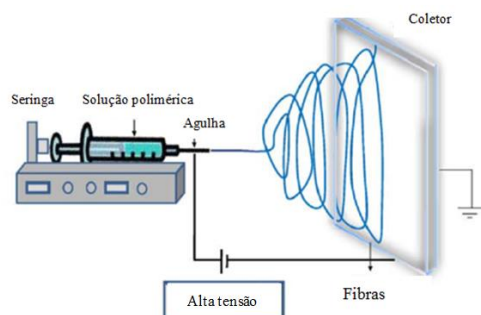


Figura 2.6 - Diagrama esquemático da montagem horizontal do processo de eletrofiação, evidenciando-se os seus componentes, tais como a seringa onde se encontra a solução polimérica, a agulha que irá ejetar a solução, a bomba infusora que controla o caudal, uma fonte de alta tensão que será aplicada na agulha e um coletor que irá recolher as fibras eletrofiadas (adaptado de [72]).

O resultado do processo de electrofiação depende das propriedades da solução, nomeadamente da viscosidade, da tensão superficial e da condutividade, bem como dos parâmetros da produção e ambientais. Todos eles que requerem uma otimização de modo a possibilitar a obtenção de fibras regulares, sem defeitos. Os parâmetros de produção englobam o potencial elé-

trico aplicado, a distância entre a agulha e o coletor e o caudal. As condições ambientais, tais como a temperatura e humidade, também podem influenciar substancialmente a morfologia e o diâmetro das fibras obtidas por eletrofiação [72].

Propriedades da solução polimérica

- **Viscosidade**

A viscosidade de uma solução é função principal da natureza, massa molecular e concentração do polímero e também do solvente, ou mistura de solventes, usada. A viscosidade da solução é importante na determinação do tamanho e morfologia das fibras produzidas. Numa solução com baixa viscosidade, não há uma formação contínua de fibras e é obtida uma mistura de grânulos e fibras. À medida que se aumenta a concentração, a forma esférica dos grânulos altera-se, tornando-se fusiforme, e posteriormente em fibras de diâmetro regular. Uma viscosidade muito elevada dificulta a ejeção da solução polimérica [72]. Quando a viscosidade da solução se encontra numa gama intermédia, que tem de ser determinada caso a caso, obtêm-se fibras regulares, sem defeitos. Com o aumento da viscosidade existe um aumento do diâmetro das fibras [72].

- **Tensão superficial**

A tensão superficial de uma solução é função principalmente dos solventes usados. A tensão superficial é a principal força opondo-se à tensão aplicada durante o início do processo de fiação. Com soluções com baixa tensão superficial é mais fácil a produção de fibras sem contatos. Soluções com tensão superficial elevada, como são as de base aquosa, são mais propensas à obtenção de fibras irregulares e com defeitos. A tensão superficial depende também da concentração, composição química e temperatura [73].

- **Condutividade**

Durante a eletrofiação, ocorre uma transferência de carga eléctrica do eléctrodo para a solução. A carga eléctrica transportada pela solução é a responsável pelo estiramento do jato, devido à repulsão entre cargas de igual sinal, durante o voo entre a agulha e o coletor. A condutividade é afetada pelos tipos de polímero e solvente utilizados, bem como a concentração do polímero e temperatura [72].

Com o aumento da condutividade elétrica existe uma descida significativa no diâmetro das fibras, enquanto que com uma baixa condutividade resulta numa insuficiente elongação do jato (através da força de repulsão elétrica) e as fibras tendem a ter diâmetros elevados [73].

Parâmetros de produção

- **Alta tensão**

É fundamental aplicar uma alta tensão à solução polimérica, dado que a formação das fibras apenas ocorre após atingir a alta tensão que vai induzir as cargas necessárias na solução juntamente com o campo elétrico e iniciar assim o processo de eletrofiação [72].

Quanto mais intenso for o campo eléctrico entre a agulha e o colector, maior a quantidade de solução que é extraída, o que facilita a formação de fibras com um maior diâmetro. Por outro lado, com o aumento da alta tensão, aumentam as forças eletrostáticas de repulsão no jato do fluído que normalmente favorece o estreitamento do diâmetro das fibras [72]. As tensões elevadas causam um maior alongamento da solução devido às elevadas forças de Colomb no jato e devido ao forte campo eléctrico, formando uma gota polimérica com forma de cone, designada por cone de Taylor. Estas forças relacionam-se com a redução do diâmetro das fibras bem como com a evaporação do solvente das fibras resultantes do processo. Para além disto, uma maior tensão, diminui o volume da gota até a formação do cone de Taylor, proporcionando uma maior probabilidade de formar contas [74].

- **Caudal**

O caudal do polímero através da seringa influencia a taxa de transferência do material. Um caudal mais baixo é mais desejável, de modo a que o solvente tenha tempo suficiente para evaporar [72], [73]. Por norma, o diâmetro e os poros das fibras aumentam com o aumento do caudal da solução e com este aumento de caudal, contas são mais propícias a serem formadas devido à indisponibilidade do tempo de secagem adequado antes da chegada ao coletor das fibras [72].

- **Tipo de coletor**

O coletor utiliza-se como um substrato condutor onde as fibras são colhidas. Normalmente utiliza-se folha de alumínio como coletor, no entanto, devido à dificuldade na transferência das fibras colhidas e devido à necessidade de fibras alinhadas para várias aplicações mé-

dicas, outros coletores são utilizados, tais como papel condutor, tecido condutor, tela metálica, haste rotatória, entre outros [72].

A escolha do tipo de coletor depende do tipo de fibras que se pretende obter. Se o objetivo é obter fibras desalinhadas, ou seja, sem orientação preferencial, o mais comum é a utilização de um coletor plano (folha de alumínio). Por sua vez, caso se utilize um coletor rotatório cilíndrico, obtêm-se fibras com alguma orientação preferencial, ou seja, fibras alinhadas. O alinhamento das fibras é determinado pelo tipo de coletor e pela sua velocidade de rotação [72].

- **Distância entre a agulha e o coletor**

A distância entre a agulha e o coletor pode também influenciar a morfologia e diâmetro das fibras. Além disso, esta distância pode nos indicar se o resultado final é eletrofiação ou eletrospay. Estudos revelaram que impor uma distância maior implica a diminuição do diâmetro das fibras [74]. Existe a necessidade de impor uma distância mínima de modo a que as fibras tenham tempo suficiente para secar antes de alcançarem o coletor. Se se pretende eletrofiar fibras mais achatadas, utilizam-se distâncias mais próximas e com o intuito de obter fibras mais arredondadas, vai-se aumentando a distância [72].

Parâmetros ambientais

Os parâmetros ambientais incluem fatores tais como a humidade e a temperatura. O aumento da temperatura favorece a produção de fibras com diâmetros menores, devido à diminuição da viscosidade da solução [75].

Relativamente à humidade, o seu aumento provoca o aparecimento de poros circulares pequenos na superfície das fibras e coalescência dos mesmos. Quando a humidade é muito baixa, o solvente pode secar e evaporar muito rapidamente, sendo a taxa de evaporação tão rápida, que pode criar um problema para o processo de eletrofiação [75].

2.2.1 Montagem experimental

Neste trabalho realizaram-se as montagens dos sistemas de eletrofiação para a produção das matrizes para o substituto dérmico e suporte celular (GEL/PCL/CS ou MT) e matrizes destinadas a desempenhar o efeito protetor da epiderme (PVP/CS).

Para a produção de ambas as matrizes usou-se uma seringa de 5 ml com um diâmetro de 12,48 mm, como se pode visualizar na Figura 2.7. No lado esquerdo de cada imagem, encontra-

se a bomba injetora (*Kd Scientific*), onde era colocada a seringa acoplada a uma agulha de calibre 23G. O crocodilo estabelece contato com a agulha, aplicando uma determinada tensão a partir da fonte de alta tensão (*iseg T1CP 300 304p*). O coletor rotatório encontra-se a uma determinada distância da ponta da agulha, acoplado a um sistema que lhe permite movimentos translacionais e rotacionais a uma baixa velocidade, de modo a obter fibras melhor distribuídas no coletor. O coletor encontra-se ligado à terra e nele pode ser colocada uma folha de alumínio ou então a folha de alumínio com lamelas de vidro por cima da mesma, conforme a finalidade de cada solução eletrofiada.

Quando o trabalho passou pelo estudo da adesão e proliferação celular ao material, nomeadamente a MT, utilizou-se o coletor com uma chapa de alumínio e lamelas de vidro.

As lamelas de vidro ficavam seguras a partir da adição de uma gota de água, fazendo com que a lamela não caia, através da tensão superficial que a água estabelece entre as duas superfícies.

Após as lamelas estarem totalmente cobertas, estas são retiradas e colocadas no exsiccador durante 2 a 3 dias para remover o excesso de ácido acético. De seguida, são reticuladas com glutaraldeído e para extrair a fração solúvel presente nas amostras são novamente expostas a vácuo para remover o excesso de GTA. No entanto esta técnica não é suficiente para remover o GTA por completo, portanto, colocaram-se as amostras numa solução de glicina (100mg/ml).

Quando o trabalho evoluiu no sentido de desenvolver a membrana de PVP/CS, as deposições foram feitas diretamente sobre a folha de alumínio. As lamelas de alumínio com as fibras foram conseguidas com a ajuda de uma punção, com um diâmetro igual ao copos de teflon usados na cultura celular.



Figura 2.7 - Montagem experimental do sistema de eletrofição no coletor cilíndrico rotatório.

2.2.1.1 Soluções para eletrofiação

Para a produção das matrizes, iniciou-se a preparação das soluções poliméricas a estudar. Deve-se ter em atenção as concentrações dos polímeros, bem como as massas dos solventes envolvidos. Na Tabela 2.1 encontram-se informações mais detalhadas relativamente aos polímeros utilizados:

Tabela 2.1 - Polímeros (solutos) e solvente utilizados para a preparação das soluções.

Material	Peso molecular (g/mol)	Fornecedor
GEL	60 000	<i>Sigma-Aldrich</i>
PCL	70 000-90 000	<i>Sigma-Aldrich</i>
CS	500 000	<i>Cognis S</i>
PEO	2 000 000	<i>Sigma-Aldrich</i>
PVP	1 300 000	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ácido acético	60,05	<i>Scharlau</i>
Etanol absoluto	46,07	<i>Panreac</i>

Neste trabalho utilizaram-se cinco polímeros diferentes, de onde resultaram duas soluções igualmente distintas:

- Soluções de GEL/PCL/CS (MT):

Para a eletrofiação da MT, prepararam-se soluções de gelatina de peixe de água fria a 2%, juntamente com policaprolactona a 2%, quitosano a 2% e poli (óxido de etileno) a 0,235%, tendo como solvente o ácido acético a 84,4% e água ultra pura a 9,38%. Todas as percentagens referentes às soluções são percentagens mássicas (w/w).

No âmbito da regeneração de tecidos, inúmeros polímeros têm sido estudados e utilizados, mais precisamente a gelatina de peixe (GEL), o policaprolactona (PCL) e o quitosano (CS), que apresentam propriedades ótimas para a adesão e proliferação celular [3].

- Soluções de PVP/CS:

Para a obtenção das fibras de PVP/CS preparam-se soluções de polivinilpirrolidona a 2%, com quitosano a 2% e poli(óxido de etileno) a 0,2% em 80% de ácido acético, 12% de água ul-

tra pura e 4% de etanol absoluto. Todas as percentagens referentes às soluções são percentagens mássicas (w/w).

Sabe-se que a cicatrização de feridas é complexa e que uma das principais complicações enfrentadas durante o processo é a presença de infeções. Deste modo, esta membrana, que foi colocada sobre a sementeira com ácido hialurónico, simulou o efeito protetor da epiderme.

Esta matriz protetora tem como finalidade criar uma barreira anti-microbiana. A escolha do quitosano nesta membrana deveu-se então às suas propriedades anti-microbianas. Apresenta um efeito anti-fúngico suprimindo a esporulação e germinação dos esporos e um efeito antibacteriano nas bactérias Gram + e Gram -. No entanto, o efeito anti-bacteriano difere entre as Gram+ e Gram- devido às características diferentes da membrana externa das bactérias. Apesar do quitosano ser um bom antifúngico e antibacteriano, tem uma maior eficiência contra os fungos [76].

O antiséptico tópico de PVP e iodo (PVP-I) é comumente utilizado para impedir infeções fúngicas e bacterianas [77]. O PVP é usado devido à sua capacidade de absorção de água para manter a ferida hidratada, daí a sua utilização neste trabalho para o desenvolvimento da membrana com um efeito protetor da epiderme.

2.2.1.2 *Produção das matrizes*

Diferentes parâmetros de eletrofiação foram testados, de modo a comparar os seus efeitos na morfologia das fibras. Com o objetivo de obter fibras com a morfologia pretendida, observaram-se as mesmas ao microscópio óptico (*Nikon Eclipse LV100*), onde é possível aferir relativamente à disposição e diâmetro das mesmas para diferentes parâmetros de produção. Posto isto, foi possível ajustar e otimizar os parâmetros de produção.

A produção das matrizes para o suporte celular (MT) e matrizes com um efeito protetor da epiderme (PVP/CS), foi realizada com os mesmos parâmetros para ambas as soluções: distância entre a agulha e o coletor de 25 cm; caudal de 0,3 ml/h; tensão de 18 kV.

2.2.1.2.1 Métodos de reticulação das matrizes

- Reticulação das matrizes de GEL/PCL/CS

Os polímeros naturais apresentam a vantagem de serem biocompatíveis e anti-inflamatórios. No entanto, a dissolução das fibras após hidratação (tal como acontece com os

polímeros hidrofílicos, nomeadamente a gelatina) é um problema presente em alguns polímeros de origem natural [55]. As fibras de gelatina apresentam uma fraca consistência estrutural em condições húmidas. Assim, os investigadores têm desenvolvido processos de reticulação para manter a estabilidade destes polímeros a longo termo [55].

A reticulação das fibras de gelatina aumenta a sua estabilidade em ambientes aquosos. O processo pode ser conseguido por métodos físicos, tais como calor e radiação, ou métodos químicos através de reticulação por fase de vapor ou líquida, que engloba alguns agentes químicos para modificar grupos funcionais laterais da gelatina [78].

Entre os vários agentes de reticulação, o mais utilizado é o glutaraldeído (GTA) na fase de vapor devido à sua elevada eficiência na estabilidade de materiais com colagénio e gelatina [79]. No entanto, o glutaraldeído é citotóxico, havendo assim a necessidade de desenvolver outras alternativas para fornecer estabilidade às fibras [55].

Para além do GTA, outros agentes de reticulação têm sido estudados, tais como carbodiimidas, glioxal, formaldeído, transglutaminase, compostos epóxi e genipina, apresentando menores riscos de citotoxicidade. No entanto, estes reticulantes não apresentam melhores propriedades ao nível da estabilidade do colagénio e gelatina, quando comparados com o glutaraldeído [79], [80].

Glutaraldeído

A reticulação com glutaraldeído envolve a reação deste com os resíduos laterais dos aminoácidos, particularmente com os grupos funcionais $-NH_2$ da lisina e hidroxilisina, formando ligações semelhantes às bases *Schiff* [81].

Neste trabalho, a deposição por vapor foi conseguida ao submeter as amostras num recipiente fechado com GTA numa estufa a 37°C [82].

No entanto, a reação do GTA com as proteínas é tão heterogénea e complexa que é possível que alguns grupos aldeído permaneçam não reagidos como grupos funcionais pendentes [81].

Tendo em conta a sua citotoxicidade, e de modo a melhorar a biocompatibilidade dos materiais à base de colagénio que foram reticulados com GTA, teve-se ter em conta a diminuição da concentração das soluções do reticulante [79], ou desenvolver um processo posterior de modo a eliminar o excesso de glutaraldeído, como por exemplo colocar as amostras num exaustor durante uma hora, depois expô-las a vácuo (exsicador) durante 24 horas ou mais [82]. Outro

procedimento possível, de modo a libertar o excesso de glutaraldeído das amostras é utilizar uma solução de glicina [79].

Segundo estudos elaborados por Bigi et al., [79] quanto maior a concentração de GTA, menor será a extensibilidade do filme, maior a tensão de rutura e menor será o inchamento do mesmo, diminuindo assim a absorção de água. No entanto, existe um limiar de concentração, que por mais se aumente a concentração de GTA, a percentagem de *crosslinking* não aumenta. Por exemplo, 0,05 wt% de GTA é suficiente para reticular 60% dos grupos amino e 1 wt% de GTA consegue atingir uma reticulação de 98%, sendo esta concentração o valor suficiente para se atingir a percentagem máxima de reticulação.

Após experiências efetuadas ao longo do trabalho, o método de reticulação por glutaraldeído demonstrou-se bastante eficaz, comparando-se os resultados após reticulação com GTA a 5% e a 50%.

Tratamento da MT com glicina após reticulação

Sendo o GTA citotóxico, existe a necessidade de removê-lo das matrizes produzidas. Para tal, mergulharam-se as lamelas numa solução de glicina em água ultra pura (100 mg/ml) durante 24h a 37°C. O glutaraldeído consegue reagir com vários grupos funcionais de proteínas, nomeadamente com a glicina. Assim, esta solução consegue reagir com os grupos aldeído livres e neutralizar o GTA em excesso [83].

- Reticulação das matrizes de PVP/CS

Irradiação por luz UV

A mistura PVP/CS não existe na natureza mas as propriedades específicas de cada polímero podem ser combinadas para produzir misturas sintéticas que possuem propriedades estruturais e mecânicas únicas. No estado sólido, os dois materiais são miscíveis e interagem a nível molecular. As novas ligações de hidrogénio parecem alterar o carácter biológico do quitosano e portanto, os parâmetros físicos globais da mistura também se alteram.

A interação da luz UV com a mistura pode refinar o processo de preparação para produzir misturas de características químicas e estruturais específicas. No entanto, há que otimizar o tempo de irradiação para reticular a mistura. Se a mistura apresentar um maior conteúdo em quitosano, este é mais recetivo a fototransformação.

Como a mistura aplicada neste trabalho é 50% de cada material, estudos revelam que com o aumento do tempo de irradiação, menor será o seu ângulo de contacto e portanto, mais hidrofílico é o material. Menor é a energia superficial, menor é a parte dispersa e consequentemente maior é a parte polar.

Estes fenómenos após a irradiação sugerem fotooxidação dos polímeros e alteração da sua estrutura.

Durante o processo de irradiação por UV, formam-se macroradicias que podem interagir entre si e alterar as propriedades da mistura. Mais precisamente os grupos radicais OH do quitosano interagem com as macromoléculas de PVP e produzem assim novos radicais e macroradicaís. Na presença de oxigénio a fotooxidação dos macroradicaís contribui para a formação de grupos polares, alterando as propriedades de superfície dos filmes [84].

Tal como na matriz ternária, a membrana de PVP e CS precisa de ser reticulada, de modo a tornar a matriz insolúvel em água.

Assim sendo, neste trabalho, as matrizes de PVP/CS foram irradiadas com luz UV (*UVP Products, CL-1000 ultraviolet crosslinker*) de 254 nm. O tempo de irradiação selecionado para a reticulação foi de uma hora. Este tempo foi o escolhido através da elaboração de estudos de perda de massa para diferentes tempos de irradiação.

2.3 Caraterização das matrizes

2.3.1 Análise morfológica

Neste trabalho, de modo a melhorar o processo de produção das matrizes, teve-se em consideração a morfologia das mesmas, para estabelecer algumas condições experimentais e obter uma visão geral das estruturas produzidas.

Esta análise morfológica é conseguida através da visualização das fibras num microscópio ótico (VisiCam 3.0, VWR) e posteriormente para uma análise mais detalhada, através de SEM.

2.3.2 Ensaio de tração mecânica

As propriedades mecânicas dos materiais permitem compreender o seu comportamento perante forças externas, podendo desenvolver deformações reversíveis. As propriedades mecânicas dos materiais sólidos elásticos podem ser descritos pela lei de Hooke, que afirma que ao aplicar-se uma tensão σ ao material, se verifica uma extensão ϵ que lhe é proporcional. Quando esta tensão σ é retirada, o corpo recupera completa e instantaneamente a sua forma inicial [85].

Assim sendo, neste trabalho estudou-se a relação tensão-deformação através de ensaios de tração mecânica, podendo determinar o módulo de Young (E) correspondente ao material, através da equação:

$$\sigma = E\epsilon \quad (\text{Equação 1})$$

Nestes testes de tração são aplicadas forças de tração, provocando o seu alongamento com a uma taxa constante até ao ponto de rutura do material. A deformação é determinada através da razão entre o alongamento do material (Δl) e o comprimento inicial da amostra (l_0), ou seja, $\epsilon = \Delta l / l_0$.

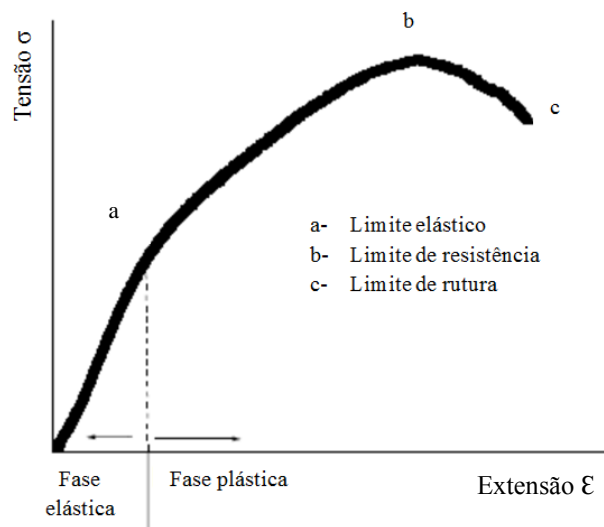


Figura 2.8 - Curva de tração, Tensão σ vs Extensão ϵ , onde se evidencia as fases mais importantes, nomeadamente a fase elástica, à qual corresponde à lei de Hooke, a fase plástica à qual o material adquire uma deformação permanente. É possível destacar também os limites da curva, tais como o limite elástico, o limite de resistência, que é a tensão máxima que o material suporta sem romper, e o limite de rutura corresponde à tensão em que o material rompe (adaptado de [85]).

Neste trabalho estudaram-se as propriedades mecânicas das matrizes de GEL/PCL/CS e matrizes de PVP/CS secas e hidratadas à temperatura ambiente, usando a máquina de tração da Rheometric Scientific, com o Minimat-Firmware 3.1 como software incorporado no computador IBM (Figura 2.9).

Para os testes de tração, foram realizadas 3 deposições para cada material. De seguida, as matrizes eletrofiadas foram submetidas a vácuo de modo a remover o excesso de solvente, durante dois dias. As matrizes de GEL/PCL/CS foram posteriormente reticuladas com GTA a 5% durante 3,5h e novamente colocadas em vácuo para remover o excesso de GTA. As matrizes de PVP/CS foram submetidas a uma irradiação por UV durante 1h.

De cada deposição, foram recortadas 5 amostras com uma largura de 1 cm e comprimento de 3 cm. A espessura das amostras variaram entre 60 e 300 μm , dependendo do material, e foi determinada com uma craveira digital Mitutoyo (500-196-20 Digimatic Digital Caliper, 0-150 mm). Metade das amostras foram hidratadas com cerca de 100 μl de água.

Os testes de tração foram realizados com uma célula de carga de 20 N, a uma velocidade de 1 mm/min.



Figura 2.9 - Ensaio de tração mecânica onde se visualiza a matriz a ser tracionada pelas garras da máquina.

De modo a avaliar o grau de reticulação, determinou-se a perda de massa das matrizes de PVP/CS, colocando-as em água.

Inicialmente as deposições de PVP/CS foram irradiados com luz UV a diferentes tempos, nomeadamente a 1, 2, 4, 7 e 10 horas e pesados (antes e depois da irradiação). Colocou-se cada

matriz submergida em 20 ml de água ultra-pura durante 24h e de seguida, removeram-se as matrizes para a tampa de uma placa de petri e permaneceram numa estufa a 37°C até secarem. A base da placa de petri, onde se encontrava a água ultra-pura, foi também colocada na estufa até a água evaporar totalmente.

Após a água evaporar e as fibras secarem, efetuou-se uma nova pesagem. Após recolher ambas as pesagens, procedeu-se ao cálculo da percentagem da perda de massa das matrizes irradiadas com diferentes tempos.

Para além dos tempos de irradiação mencionados, efetuaram-se irradiações das matrizes por luz UV a 15, 30, 45 e 60 min, dado que a elevados tempos de irradiação as fibras degradavam-se e tornavam-se solúveis em água.

A perda de massa foi determinada pela equação:

$$\text{Perda de Massa (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100\% \quad (\text{Equação 2}),$$

onde m_i é a massa inicial da membrana (antes da reticulação) e m_f corresponde à massa final da membrana (depois do tempo de reticulação correspondente).

2.3.4 SEM

O SEM (*Scanning Electron Microscopy*) cria uma imagem digital da amostra através do varrimento de um feixe de eletrões focado sobre a amostra e medição da corrente de eletrões emitidos da amostra. O SEM produz imagens de alta ampliação e resolução com informações sobre a topografia e composição das amostras.

Neste trabalho, o uso do microscópio eletrónico de varrimento (Zeiss Auriga) permitiu estudar mais detalhadamente a morfologia das fibras, bem como determinar o diâmetro médio das mesmas, usando posteriormente o programa *Image J*.

2.3.5 ATR-FTIR

Para uma análise da composição química das membranas de PVP/CS/PEO, indentificou-se através de um espectrómetro de infravermelho baseado na transformada de Fourier, operando no modo de reflexão total atenuada, designado por ATR-FTIR - *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectrometer* (Nicolet Nexus Continuum, Thermo Scientific) os compostos presentes nas amostras não reticuladas e reticuladas nos 4 tempos selecionados (0

min, 15 min, 60 min e 600 min), comparando-as com os materiais individualmente (PVP, CS e PEO), na forma de filme.

Esta técnica baseia-se no facto das ligações químicas das substâncias possuírem frequências de vibração específicas. Através desta análise, é possível identificar os picos das amostras correspondentes a cada material, através da observação do espectro de infravermelho obtido e aferir se existem alterações ou influências na composição química das amostras quando estas são reticuladas.

O espectro foi adquirido na gama 4000-400 cm^{-1} .

2.3.6 DSC/TGA

As propriedades térmicas das membranas foram estudadas por DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), que permite determinar temperaturas de transições de fase e compreender as misturas poliméricas e propriedades físicas finais dos materiais.

O DSC é um aparelho de análise térmica que permite aferir como as propriedades físicas da amostra podem mudar com a temperatura [86].

A compreensão das inter-relações entre a estrutura e as propriedades é determinante para a selecção de um material polimérico para uma dada aplicação.

Verifica-se frequentemente que as propriedades desejadas num material polimérico dependem em grande escala da flexibilidade e simetria das cadeias e das forças de atração entre elas; estas características moleculares e intermoleculares refletem-se nas propriedades físicas e mecânicas dos polímeros, tais como T_g (temperatura de transição vítrea), T_m (temperatura de fusão), T_d (temperatura de desnaturação), módulo de Young (E) e o grau de cristalinidade.

Deste modo, recorreu-se à técnica DSC para determinar as temperaturas de fusão (T_m), de transição vítrea (T_g) e de desnaturação (T_d) das amostras desenvolvidas neste trabalho, tendo como controlo os polímeros puros em filmes.

2.3.7 WVTR

A WVTR (*Water Vapour Transmission Rate*) determina a taxa de transmissão de vapor de água por unidade de área e por unidade de tempo sob condições específicas de temperatura e humidade [87]. Considerando a junção da matriz de GEL/PCL/CS com a matriz de PVP/CS um

potencial regenerador da pele, este método caracteriza o ritmo a qual a água é transmitida a partir do leito da ferida para o ambiente externo. A taxa de transmissão de vapor de água das matrizes deve ser adequada, de modo a evitar tanto o excesso de desidratação devido à elevada WVTR, como a maceração da ferida e contaminação devido à baixa WVTR.

A WVTR da pele normal é cerca de $204 \pm 12 \text{ g/m}^2/\text{dia}$, enquanto na pele com uma ferida o valor de WVTR pode chegar desde $278 \pm 26 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ para queimaduras de primeiro grau, até valores $5138 \pm 202 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ para queimaduras granulares [87].

De modo a determinar a taxa de transmissão de vapor de água das fibras produzidas (MT e PVP/CS/PEO), utilizaram-se frascos de vidro contendo cerca de 1/3 de água ultrapura. Os frascos de vidro foram cobertos com as matrizes e estas foram fixadas com *parafilm* e colocadas à temperatura ambiente durante a noite. Os frascos foram de seguida colocados num excicador com sílica gel a uma temperatura controlada de 37°C , para que a humidade relativa entre o interior e exterior do frasco fosse 0:100 (humidade relativa exterior: humidade relativa interior). As amostras foram pesadas num intervalo de tempo de uma hora durante 10h.

Após as pesagens, construíu-se uma curva de perda de massa versus tempo, e de seguida determinou-se a taxa de transmissão de vapor de água através da equação:

$$WVTR (g/m^2/dia) = \frac{declive*24}{A} \quad (\text{Equação 3}),$$

Onde A é a área exposta ao permeante [87].

2.4 Testes *in vitro*

Os testes *in vitro* permitem-nos aferir a viabilidade das células semeadas sobre o *scaffold* desenvolvido, avaliando a adesão e proliferação das linhas celulares. Estes testes auxiliam na compreensão do comportamento das células, de modo a que posteriormente os testes *in vivo* sejam realizados e apresentem os melhores resultados possíveis.

Uma cultura celular refere-se à remoção de células a partir de um animal ou planta e o seu subsequente crescimento num ambiente artificial favorável. A grande vantagem do uso de culturas celulares é a consistência e reprodutibilidade dos resultados, que podem ser obtidos a partir de um grupo de células clonais. Para se efetuar uma cultura celular, podem-se utilizar cé-

lulas primárias provenientes de tecidos vivos, através de um tecido animal excisado ou por explantes, ou então linhas celulares [88], [89]

As culturas foram realizadas em placas estéreis de 24 poços (com uma área de 2 cm² por poço), onde se colocaram copos de teflon, previamente esterilizados num banho de etanol a 70% (v/v). Antes de se proceder à montagem da cultura, os poços foram retirados do banho em etanol e secos dentro da câmara e as lâmelas contendo as matrizes foram também esterilizadas com etanol a 70%.

Neste trabalho foram realizadas várias culturas com diferentes condições e diferentes células. Foram utilizadas linhas celulares de fibroblastos HFFF2 e células primárias provenientes de explantes de amostras de pele humana. As amostras de pele foram fornecidas pelo Hospital São José, através da minha co-orientadora cirurgiã plástica Dr^a Maria Angélica Almeida.

Tanto as células da linha HFFF2 quanto as células primárias foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 1% Glutamax, 10% v/v de soro proveniente de feto de bovino (*foetal bovine serum* - FBS) e 100 U/ml de antibiótico composto por estreptomicina e penicilina, numa incubadora (Sanyo CO₂ Incubator) a 37°C e com uma atmosfera de CO₂ a 5%.

Nota: Quando se refere a células semeadas em HA, significa HA+DMEM.

2.4.1 Extração enzimática de células de biópsias de pele e extração de células a partir de um explante de pele

Um dos objetivos deste trabalho passava pela extração enzimática de células a partir de biópsias de pele humana (Figura 2.10), de modo a efetuar testes *in vitro* com células primárias, que permitem obter respostas mais semelhantes ao comportamento *in vivo*.

Antes de realizar a extração das células, as amostras de pele humana foram previamente colocadas em soro fisiológico com a adição de antibiótico (penicilina e estreptomicina (Gibco technologies) e antimicótico (anfotericina (Gibco technologies)) de modo a evitar possíveis contaminações das amostras. Antes do manuseamento das amostras, estas foram lavadas com PBS⁻.

Para se proceder à extração enzimática, primeiro separou-se a camada dérmica da epidermica, usando a dispase (protease neutra (Serva)) como enzima. De seguida, para a digestão enzimática da epiderme recorreu-se a um tratamento com tripsina (Amresco)/EDTA (Alfa Ae-

sar), enquanto para a digestão enzimática da derme efetuou-se um tratamento com collagenase (Serva).

Os procedimentos adotados para a extração enzimática foram baseados em três trabalhos que apresentam diferentes abordagens de extrair células de tecidos humanos [90]–[92].

Para a separação das camadas dérmica e epidérmica começou-se por recortar pedaços das amostras de pele com 1 cm² cada. Posteriormente, colocou-se os pedaços de pele num tubo de falcon com 10 ml de PBS⁺⁺ (que foi previamente preparado com concentrações mais elevadas de cálcio, dado a necessidade deste ião por parte da dispase). O tubo de falcon foi colocado no frigorífico a 4°C e após 24h separaram-se mecanicamente as camadas.

A epiderme após separada da derme, foi triturada com um bisturi e preparou-se uma solução de tripsina e EDTA em PBS⁻, que foi purificada ao passá-la por um filtro com poros de 100 µm (BD Falcon). De seguida colocou-se a epiderme num tubo de falcon juntamente com 5 ml da solução de Tripsina/EDTA, agitou-se suavemente e incubou-se a 37°C durante 1h. Após 1h de incubação, agitou-se o tubo de falcon (SARSTEDT) no vortex (VWR) alguns segundos, de modo a facilitar a extração das células. A solução foi decantada para um novo tubo de falcon e adicionou-se 5 ml de DMEM, com o intuito de neutralizar a ação da tripsina. No tubo de falcon onde ficou a amostra de pele, adicionou-se 5 ml de tripsina/EDTA e incubou-se novamente 1h a 37°C. A mistura do meio com a solução decantada foi então colocada em placas de petri aderentes (SARSTEDT) e estas foram incubadas 4h a 37°C. Após as 4h de incubação, as placas de petri foram visualizadas no microscópio óptico (Nikon Eclipse Ti-S), de modo a constatar se as células foram ou não extraídas das amostras de pele. Os passos desde a primeira hora de incubação foram repetidos durante 4h consecutivas.

Quanto à derme, após ser separada da epiderme, foi triturada e colocada num tubo de falcon com 1 ml da solução de collagenase (2,5 mg/ml), juntamente com 4 ml de PBS⁺⁺ e posteriormente incubou-se a 37°C durante 3h. Decantou-se a solução e adicionou-se 5 ml de DMEM num novo tubo de falcon, homogeneizou-se e colocou-se a mistura em placas de petri aderentes e incubou-se a 37°C. Tal como no tratamento da epiderme com tripsina e EDTA, visualizou-se as placas de petri no microscópio óptico de modo a verificar a presença ou não das células.

Para além da extração enzimática de células, procedeu-se à extração de células a partir de explantes de biópsias de pele humana. Cortaram-se amostras de pele com cerca de 1 cm² de lado, e foram colocadas em placas de petri aderentes, umas com a epiderme em contacto com a placa e outras com a derme virada para baixo. De modo a aderir a amostra na placa, colocou-se uma lamela de vidro na parte superior da amostra, colocando ainda por cima da lamela um anel metálico (previamente esterilizado com álcool a 70%) de modo a causar pressão e peso no pe-

daço de pele. De seguida, adicionou-se 5 ml de DMEM e incubou-se a 37°C e após alguns dias as placas foram visualizadas no microscópio óptico.

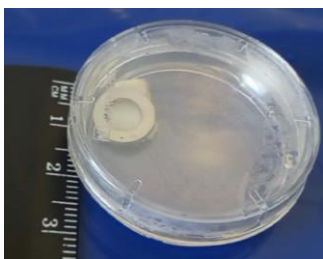


Figura 2.10 - Explante de biópsia de pele humana, com a derme voltada para baixo.

2.4.2 Culturas com a linha celular HFFF2 e células extraídas do explante em HA

Nas culturas celulares foram utilizadas células fibroblásticas:

- provenientes da linha celular HFFF2 (*Human Caucasian Foetal Foreskin Fibroblast*), que apresentam um tempo de vida finito e derivam de fibroblastos isolados a partir da derme de um feto humano com 14-18 semanas de idade;
- obtidas por explante de biópsias de pele humana.

As linhas de fibroblastos caracterizam-se por sintetizar intracelularmente colagénio tipo I, que depois é secretado para o meio. Este tipo de colagénio é o principal constituinte da matriz extracelular do tecido conjuntivo.

Inicialmente efetuou-se uma cultura com a linha celular em passagem P10 de modo a analisar a adesão, proliferação e viabilidade das células quando são semeadas nos materiais eletrofiados, usando DMEM completo como meio de cultura ou DMEM completo ao qual é adicionado HA a 1,5%. Utilizaram-se 4 materiais diferentes, nomeadamente a gelatina de peixe (GEL), a policaprolactona (PCL), o quitosano (CS) e a matriz ternária (GEL/PCL/CS) (Figura 2.11).

Para cada material testaram-se 3 condições de cultura: o controlo de células semeadas no material correspondente, usando DMEM como meio: células semeadas em HA; controlo de material (sem células). Para além destas condições de cultura, construiu-se ainda um controlo de células semeadas diretamente na placa de 24 poços. A sementeira foi efetuada com uma densi-

dade de 2×10^4 células/cm². Efetuaram-se ainda controlos de meio de cultura (DMEM e HA) diretamente nos poços de poliestireno.

As matrizes que continham gelatina de peixe, nomeadamente a MT (GEL/PCL/CS) e GEL, foram posteriormente reticuladas com glutaraldeído a 5% e tratadas com a solução de glicina.

A sementeira foi acompanhada durante 2 dias, sendo feitas duas leituras de absorvância às 24 e 48h para efetuar os testes de viabilidade celular. Às 24h consegue-se aferir relativamente à adesão celular da sementeira nos diferentes materiais, enquanto às 48h dá-nos indicação relativamente à proliferação celular.

De seguida, procedeu-se à fixação das células com paraformaldeído (PFA), com o intuito de marcar com fluoróforos o núcleo e o citoesqueleto das células para as visualizar por microscopia de fluorescência.

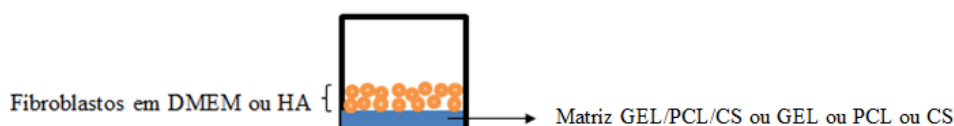


Figura 2.11 - Representação esquemática dos poços para a construção da cultura celular, onde se visualiza a matriz polimérica (GEL/PCL/CS ou GEL ou PCL ou CS) com a sementeira de fibroblastos por cima em meio de cultura (DMEM ou HA).

2.4.3 Culturas em bicamada com a linha celular HFFF2 e células extraídas do explante em HA

Tal como nas culturas em monocamada, nas culturas em bicamada foram utilizadas células fibroblásticas da linha HFFF2 e células obtidas por explante de biópsias de pele humana.

As matrizes de GEL/PCL/CS utilizadas nestas culturas foram tratadas com GTA e glicina. As matrizes de PVP/CS foram irradiadas uma hora com UV.

Antes de se proceder à cultura em bicamada como esquematizado na Figura 2.12, lançaram-se culturas em monocamada com as matrizes de GEL/PCL/CS e PVP/CS, de modo a comparar a adesão e proliferação celular nas diferentes matrizes, através da leitura de absorvâncias às 24 e 48h.

Estas culturas em monocamada foram realizadas numa placa de 24 poços com recurso aos poços de teflon, tendo 4 condições de cultura para cada material, nomeadamente: fibroblastos semeados no material em meios de cultura diferentes, em 1) DMEM ou 2) HA; controlo de material (sem células) em 3) DMEM ou 4) HA. Para além das condições de cultura para cada material, teve-se em conta controlos de células diretamente na placa de 24 poços nos diferentes meios de cultura. As sementeiras foram realizadas com uma densidade de 2×10^4 células/cm².

As sementeiras em bicamada foram elaboradas tendo em consideração 4 condições de cultura (Tabela 2.2). Entre as matrizes inferior e superior, as células foram semeadas e embebidas nos diferentes meios de cultura (num volume de 50 µl) e por cima da última matriz colocou-se novamente o meio de cultura (200 µl) (Figura 2.12).

Nas culturas celulares em bicamada não se quantificou a adesão e proliferação celular através do teste com a resazurina. Apenas se visualizaram ambas as matrizes (matriz inferior e matriz superior) ao microscópio, de modo a constatar se houve adesão celular, fixando as células e marcando o citoesqueleto e núcleos das mesmas. A construção da cultura em bicamada foi também realizada em placas de 24 poços, com recursos aos poços de teflon, com uma densidade de 2×10^4 células/cm².

Lançaram-se culturas celulares com diferentes combinações entre as matrizes inferior e superior e com meios de cultura diferentes, tal como a Tabela 2.2 e Figura 2.12 demonstram, com o intuito de comparar a densidades celulares entre as diferentes condições.

Tabela 2.2 - Condições para o lançamento das culturas celulares em bicamada, onde se destacam as matrizes inferior (GEL/PCL/CS) e superior (GEL/PCL/CS ou PVP/CS) nos diferentes meios de cultura (DMEM ou HA).

	Matriz inferior	Meio de cultura	Matriz superior
Condição 1	GEL/PCL/CS	DMEM	GEL/PCL/CS
Condição 2	GEL/PCL/CS	HA	GEL/PCL/CS
Condição 3	GEL/PCL/CS	DMEM	PVP/CS
Condição 4	GEL/PCL/CS	HA	PVP/CS

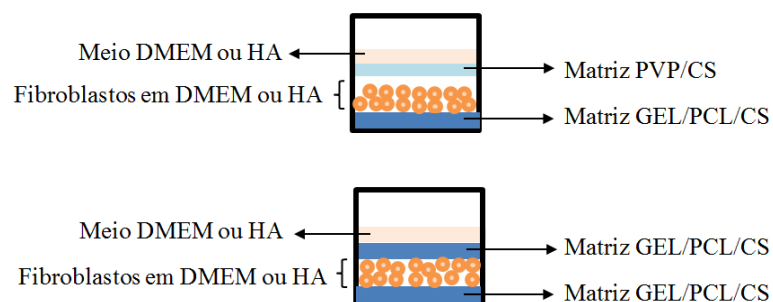


Figura 2.12 - Representação esquemática dos poços para a construção da cultura celular em bicamada, onde se visualiza as matrizes poliméricas inferior constituída por GEL/PCL/CS e superior (GEL/PCL/CS ou PVP/CS) entre a sementeira de fibroblastos em meio de cultura.

2.4.4 Viabilidade celular

Para os testes de viabilidade celular, utilizou-se um método colorimétrico que se baseia na utilização da resazurina como indicador da viabilidade celular, neste trabalho usada sob a forma de uma solução a 0,2 mg/ml em PBS. Este composto é um corante de cor azul não fluorescente que, quando é metabolizado pelas células, é reduzido a um composto altamente fluorescente e cor de rosa, a resorufina. É possível medir as alterações de cor a partir da medição dos valores de absorvância do meio. Neste trabalho as medições foram efetuadas através de leituras de absorvância a 570 e 600 nm, que correspondem aos valores máximos de absorvância da resorufina e resazurina, respetivamente.

Neste trabalho, para efetuar as leituras de absorvância utilizou-se um leitor de placas (Biotek ELX 8000UV), utilizando-se placas de 96 poços nos quais se colocava 150 µl de amostra. Antes de se proceder à leitura, foi colocado em cada amostra a avaliar o meio contendo 80% de DMEM e 20% da solução de resazurina, seguindo-se uma incubação de 4 horas a 37°C.

Para os testes de viabilidade celular nas células embebidas no HA, foi necessário utilizar uma pipeta para fluídos (Microman), devido à dificuldade de homogeneização entre o gel e a resazurina. Contudo, a homogeneização pode não ter sido 100% eficaz, o que pode levar a uma baixa eficácia de difusão da resazurina até às células e assim dificultar a sua metabolização.

2.4.5 Observação do núcleo e citoesqueleto das células

Para a observação do núcleo e citoesqueleto das células semeadas nos materiais, recorreu-se ao microscópio de epifluorescência (Nikon Ecilpse Ti-S) com uma fonte de luz de mercúrio (Nikon) e um bloco de filtros.

De modo a visualizar os constituintes das células seguiram-se os protocolos de fixação e marcação celular.

Primeiramente, foi efetuada a fixação celular que consiste num processo químico que paralisa o metabolismo celular, permitindo preservar os tecidos biológicos da decomposição e impedir qualquer tipo de alteração indesejada. Os fixadores preservam a estrutura dos tecidos ao interagirem com os grupos aminos das proteínas, formando novas ligações covalentes. Neste trabalho utilizou-se o paraformaldeído (Applichem Panreac) a 3,7% (v/v) como fixador.

Após a fixação celular, fez-se a marcação do citoesqueleto. Este processo é efetuado através da utilização da faloídina com o fluoróforo *Acti-stain 555*. O citoesqueleto, uma das principais estruturas da célula, forma uma rede altamente dinâmica e é composto por filamentos intermediários, microtúbulos e filamentos de actina. Os filamentos de actina são formados por uma subunidade proteica, designada por actina e atuam no citoplasma. A faloídina, um péptido pertencente à classe das toxinas, que penetra sobre a estrutura dos filamentos de actina, interfere com os movimentos celulares, estabilizando-os. Deste modo, utilizaram-se marcadores com faloídina e fluoróforos para que seja possível visualizar o citoesqueleto das células através de imunofluorescência.

Após a marcação do citoesqueleto, procedeu-se à marcação dos núcleos das células. Esta marcação é conseguida através da utilização de um corante nuclear, nomeadamente o DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol), que emite fluorescência azul após a sua ligação à região adenina-timina do DNA.

3 Apresentação e Discussão de Resultados

3.1 Matrizes unitárias e ternária

3.1.1 Produção e caracterização

3.1.1.1 Matrizes de PCL

3.1.1.1.1 Morfologia

De modo a aferir a uniformidade da morfologia das fibras produzidas, presença ou não de pontos de fusão, porosidade, defeitos e determinação do diâmetro médio das fibras recorreu-se ao microscópio eletrónico de varrimento.

A morfologia e diâmetros das fibras dependem da concentração do polímero e do solvente utilizado. A solução de PCL foi efetuada com 20% de PCL em 80% de ácido acético glacial e posteriormente eletrofiada com os parâmetros de produção otimizados com uma tensão de 12 kV, a um caudal de 0,3 ml/h e uma distância de 25 cm entre a agulha e o coletor.

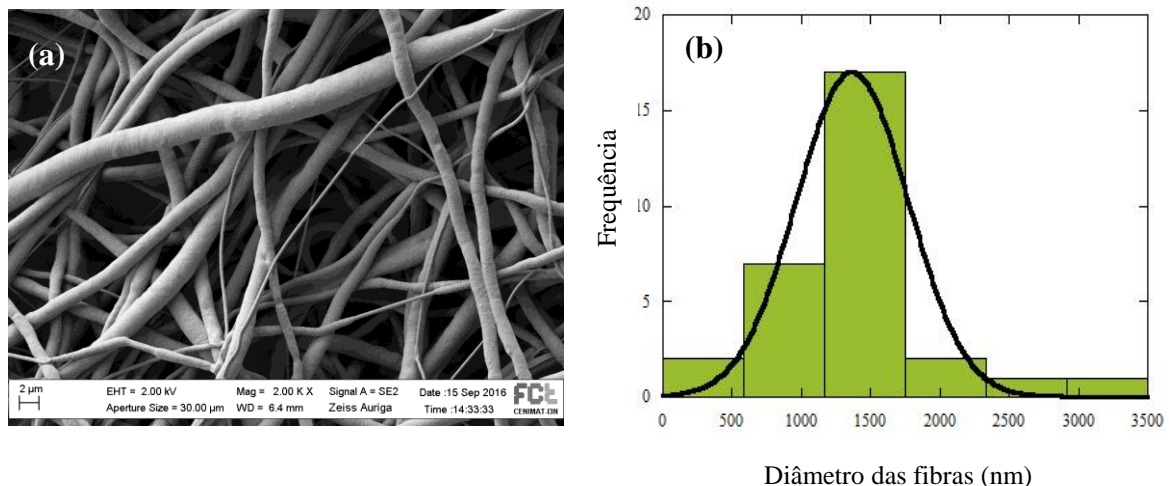


Figura 3.1 - Imagem das fibras de PCL obtida por SEM com uma ampliação de 2000x (a) e histograma representativo da frequência dos diâmetros das fibras (nm) de PCL (b).

Tabela 3.1 - Diâmetro médio das fibras e desvio padrão obtidos para as fibras de PCL.

PCL	
Diâmetro médio das fibras (nm)	Desvio padrão (nm)
1368	571

Analisando a imagem obtida por SEM (Figura 3.1 (a)), não se verificam pontos de fusão nem porosidade nas fibras de PCL. No entanto, não existe uma uniformidade na morfologia, apresentando uma vasta gama de diâmetros, como se pode constatar no histograma (Figura 3.1 (b)), cujos diâmetros de PCL podem variar até 3500 nm. O diâmetro médio das fibras de PCL foi de 1368 ± 571 nm (Tabela 3.1).

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os da literatura, o diâmetro médio das fibras de PCL encontram-se na gama de valores esperados. No trabalho de Susana Raquel Gomes, 2013, as fibras de PCL (20% de PCL e 100% de AA) apresentaram um diâmetro médio mais elevado (cerca de 1850 nm). No entanto, este aumento deve-se aos parâmetros de produção utilizados terem sido diferentes. A autora utiliza uma distância entre a agulha e o coletor inferior (10 cm), implicando um aumento do diâmetro médio das fibras [74].

3.1.1.2 Matrizes de GEL

3.1.1.2.1 Morfologia

A gelatina, de modo a evitar a sua dissolução em meio hidratado, necessita de ser reticulada, para formar novas ligações covalentes. Com o intuito de compreender as consequências do processo de reticulação, recorreu-se ao SEM para analisar as fibras reticuladas e não reticuladas.

As soluções de GEL foram produzidas com 25% de GEL numa solução de 90% de ácido acético e 10% de água e posteriormente eletrofiadas com os parâmetros de produção otimizados correspondentes a uma tensão de 15 kV, um caudal de 0,3 ml/h e uma distância de 25 cm entre a agulha e o coletor.

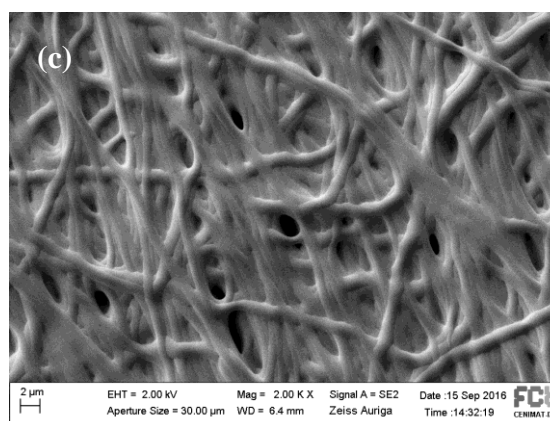
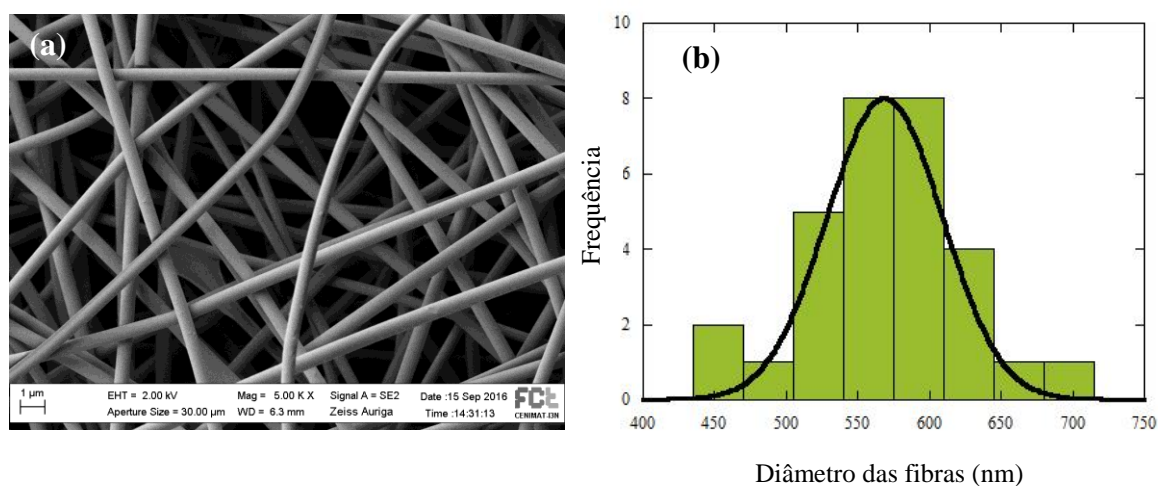


Figura 3.2 - Imagem das fibras de GEL não reticuladas obtida por SEM com uma ampliação de 5000x (a) e histograma representativo da frequência dos diâmetros das fibras de GEL não reticuladas (b). Imagem obtida por SEM com ampliação de 2000x das fibras de GEL reticuladas (c) não sendo possível determinar os diâmetros das fibras.

Tabela 3.2 - Diâmetro médio das fibras bem como o desvio padrão obtidos para as fibras de GEL sem reticulação. Nas fibras de GEL com reticulação não foi possível determinar o diâmetro médio.

	Diâmetro médio das fibras (nm)	Desvio padrão (nm)
GEL sem reticulação	569	57
GEL com reticulação	-	-

Com a análise através do SEM, foi possível encontrar grandes diferenças na morfologia das fibras de GEL reticuladas e não reticuladas.

As fibras não reticuladas (Figura 3.2 (a)) indicaram uma morfologia uniforme sem pontos de fusão, defeitos ou poros nas fibras. Através da determinação dos diâmetros, conclui-se que as fibras apresentaram um diâmetro médio de 569 ± 57 nm e que a distribuição de diâmetros segue uma distribuição normal (Figura 3.2 (b)).

Já no caso das fibras de GEL reticuladas com GTA, a Figura 3.2 (c) demonstra uma fusão parcial das fibras que é justificada pela presença de vapor de água durante o processo de reticulação [85]. Devido à fusão das fibras não foi possível determinar o diâmetro médio das fibras. Assim, confirma-se que o método de reticulação com GTA altera a morfologia das fibras.

3.1.1.3 Matrizes de quitosano

3.1.1.3.1 Morfologia

A solução de CS foi produzida com a mistura de 2% de CS e 0,392% de PEO numa solução de 90% de ácido acético e 10% de água. A solução foi posteriormente eletrofiada com os seguintes parâmetros de produção: tensão de 18 kV, caudal de 0,3 ml/h e 25 cm de distância entre a agulha e o coletor.

A morfologia das fibras eletrofiadas de CS foi avaliada por SEM.

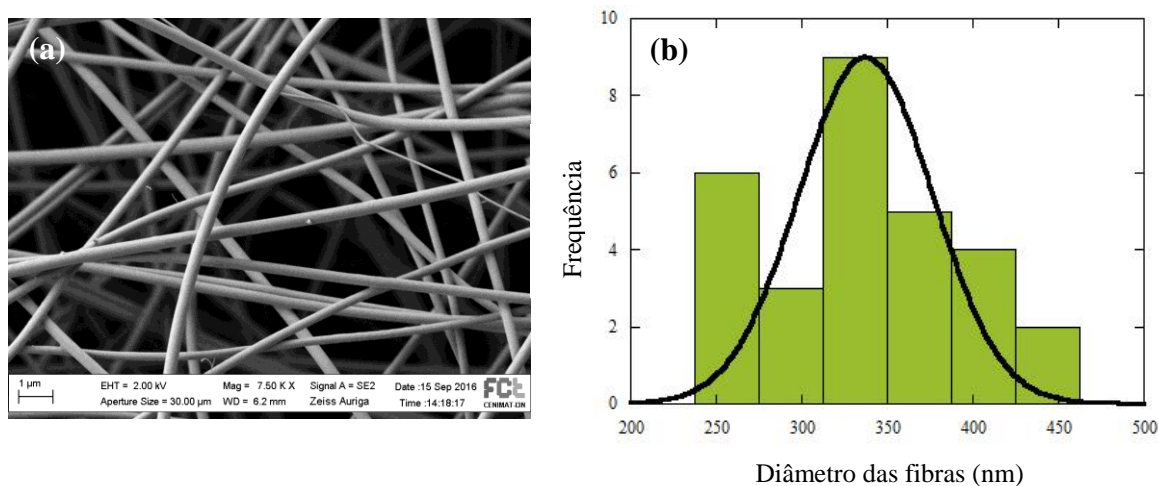


Figura 3.3 - Imagem das fibras de CS obtida por SEM com uma ampliação de 7500x (a) e histograma representativo da frequência dos diâmetros das fibras (nm) de CS (b).

Tabela 3.3 - Diâmetro médio das fibras e desvio padrão obtidos para as fibras de CS.

CS	
Diâmetro médio das fibras (nm)	Desvio padrão (nm)
337	55

Relativamente à morfologia das fibras de CS (Figura 3.3 (a)), pode-se constatar que não apresentaram pontos de fusão, porosidade ou defeitos. A morfologia demonstrou-se uniforme e os diâmetros das fibras variaram entre 240 e 460 nm, apresentando um diâmetro médio de 337 ± 55 nm, estando os valores maioritariamente dentro da distribuição normal.

Segundo Susana Raquel Gomes [85], as fibras de CS apresentaram um diâmetro médio de 619 ± 227 nm. Esta diferença de valores entre os obtidos e os esperados não foi tão significativa, tendo em conta o desvio padrão obtido no trabalho da autora.

3.1.1.3.2 DSC/TGA dos polímeros puros em filmes

O filme de CS não apresentou quaisquer valores de temperatura de fusão, pois este polímero não funde. A gelatina em filme apresentou uma perda de massa contínua, o que impossibilitou a visualização de picos. No entanto, segundo a literatura, a gelatina apresenta uma temperatura de desnaturação característica, nomeadamente entre os 75°C e 110°C, aproximadamente [93], [94], [95]. A análise por DSC do PVP não foi muito conclusiva. Segundo o que se encontra descrito na literatura, o PVP apresenta uma temperatura de transição vítrea numa elevada gama de valores, nomeadamente entre 43,85°C e 177,85°C [96], no entanto não foi possível observar a presença de um pico dentro dessa gama de valores através do termograma, apenas uma curva endotérmica bastante ténue perto dos 160°C, que poderá eventualmente corresponder à T_g do PVP. As temperaturas de fusão do PCL e PEO em filmes foram facilmente visualizadas nos termogramas, apresentando valores de 64,2°C e 69,6°C, respetivamente.

3.1.1.4 Matrizes de GEL/PCL/CS (MT)

3.1.1.4.1 Morfologia

As soluções de GEL/PCL/CS foram produzidas com 2% de GEL, 2% de PCL, 2% de CS, 0,235% de PEO numa mistura de 90% de ácido acético e 10% de água. As fibras foram então

geradas por eletrofiação com os seguintes parâmetros de produção: tensão de 18kV, caudal de 0,3 ml/h e 25 cm de distância entre a agulha e o coletor.

Para caracterizar morfologicamente as fibras produzidas por eletrofiação recorreu-se ao SEM.

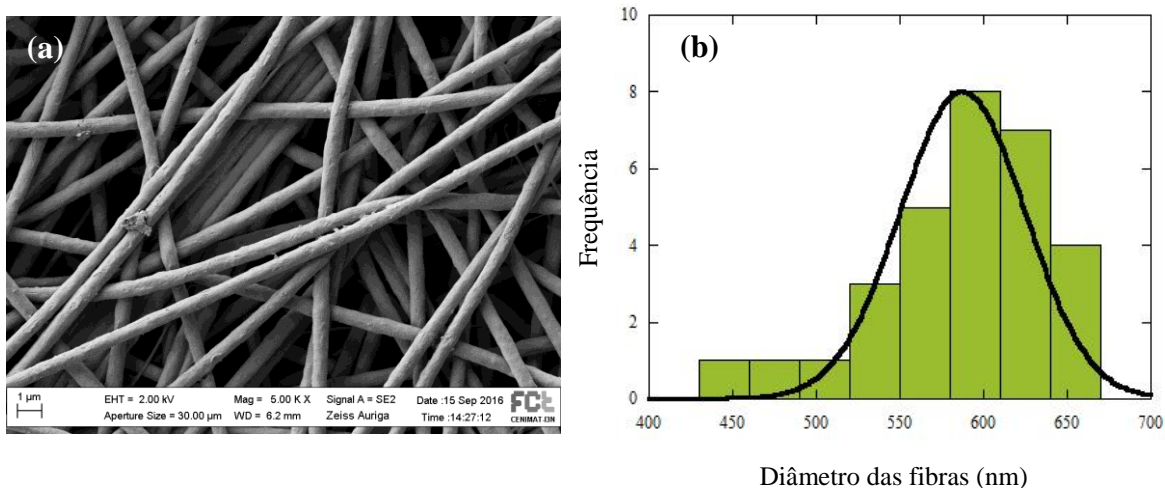


Figura 3.4 - Imagem por SEM das fibras de MT sem reticulação com ampliação de 5000x (a) e o respetivo histograma, indicando a distribuição do diâmetro das fibras (b).

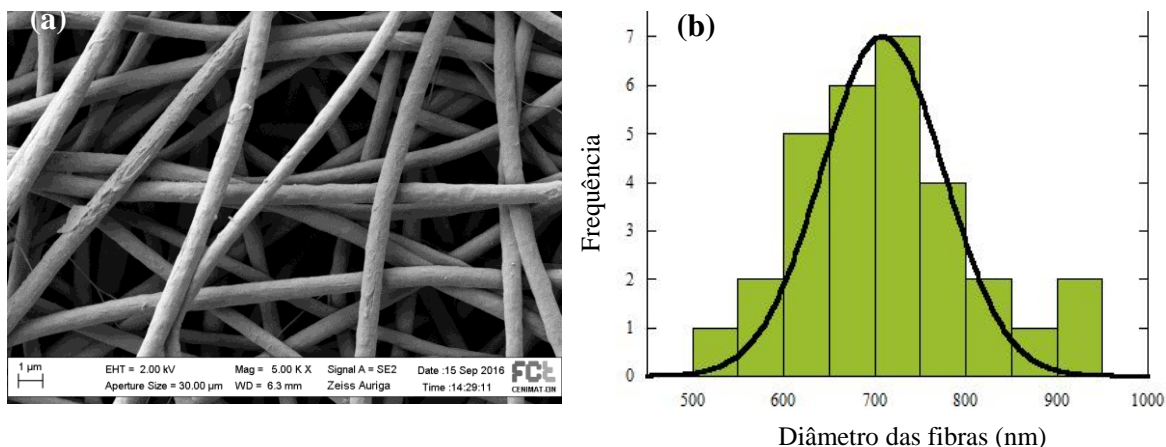


Figura 3.5 - Imagem por SEM das fibras de MT com reticulação com ampliação de 5000x (a) e o respetivo histograma, indicando a distribuição do diâmetro das fibras (b).

Através das imagens obtidas pelo SEM verifica-se uniformidade na morfologia das fibras de MT com e sem reticulação. Não se verificam pontos de fusão nem porosidade nas fibras.

Tabela 3.4 - Diâmetro médio das fibras e desvio padrão obtidos para as fibras de MT com e sem reticulação.

	Diâmetro médio das fibras (nm)	Desvio padrão (nm)
MT sem reticulação	588	53
MT com reticulação	709	95

Relativamente ao diâmetro das fibras, as matrizes ternárias sem reticulação apresentaram um diâmetro médio semelhante ao obtido nas matrizes de gelatina não reticuladas (569 ± 57 nm). Já as fibras com reticulação apresentaram um diâmetro médio superior face às não reticuladas, 709 ± 95 nm e 588 ± 53 nm respetivamente. Em ambos os casos observa-se que a distribuição de diâmetros segue uma distribuição normal (Figuras 3.4 (b) e 3.5 (b)).

3.1.1.4.2 DSC/TGA da componente dérmica

Dado que a MT (componente dérmica) e o PVP/CS (componente epidérmica) seriam utilizados em seres humanos, é imprescindível que os materiais se mantenham intactos a temperaturas baixas (37°C).

Relativamente à matriz ternária (GEL/PCL/CS) com e sem reticulação, ambas apresentaram a mesma T_m , 60,2 e 60,1°C, respetivamente, que correspondem à temperatura de fusão do PCL [97]. No entanto, a MT sem reticulação exibiu uma temperatura adicional, nomeadamente a 85,8°C, que indica a temperatura de desnaturação da gelatina presente na mistura polimérica [93], [94], [95]. Esta T_d deveria ser evidente também na MT com reticulação.

Contudo, devido ao processo de reticulação da componente dérmica, este valor poderá estar dissimulado mesmo estando a ocorrer o processo de desnaturação, ou então não ocorre desnaturação devido ao facto da gelatina estar reticulada e as cadeias poliméricas terem perdido mobilidade devido às ligações covalentes.

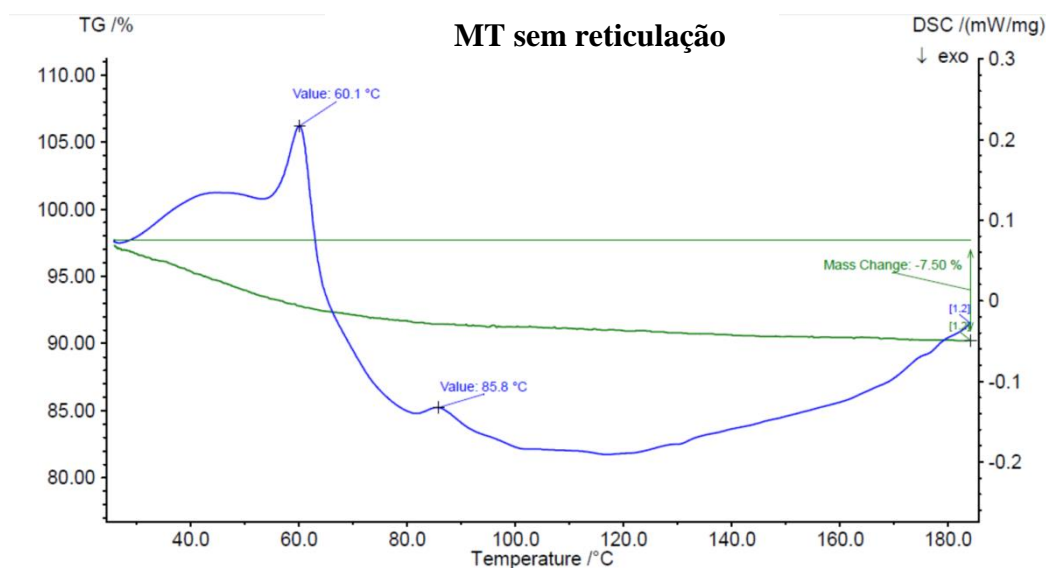


Figura 3.6 – Termograma obtido por DSC da MT sem reticulação, evidenciando-se uma temperatura de fusão correspondente ao PCL presente na amostra (60,1°C) e uma temperatura de desnaturação que corresponde à gelatina (85,8°C). Verificou-se uma perda de massa cerca de 7,5% devida à perda de água adsorvida na matriz.

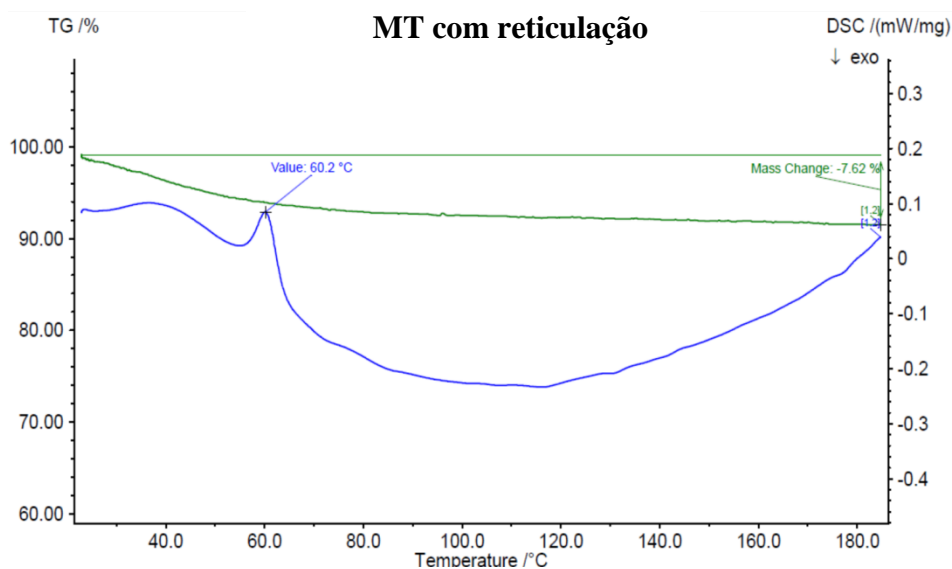


Figura 3.7 - Termograma obtido por DSC da MT com reticulação, evidenciando-se uma temperatura de fusão correspondente ao PCL presente na amostra (60,2°C). Verificou-se uma perda de massa cerca de 7,6% devida à perda de água adsorvida na matriz.

3.1.1.4.3 Taxa de Transmissão de Vapor de Água (WVTR)

A taxa de transmissão de vapor de água permite determinar o fluxo de vapor de água por unidade de tempo, através de uma unidade de área, sob condições específicas de temperatura e humidade.

Sendo a matriz, constituída por GEL/PCL/CS, um potencial substituto da derme, auxiliando na regeneração da mesma quando se encontra danificada, este parâmetro caracteriza a taxa à qual a água sob a forma de vapor pode ser transmitida a partir do leito da ferida para o ambiente externo através da membrana.

A WVTR da matriz deve ser adequada de modo a que não seja excessiva a desidratação da ferida devido à elevada taxa de transmissão de vapor de água, e evitar a maceração e contaminação da ferida devido à baixa WVTR [87]. Assim, efetuaram-se os testes para a matriz GEL/PCL/CS sem reticulação e reticulada com GTA a 5% durante 3,5h, tendo sido obtidos os resultados que se encontram na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Taxas de transmissão de vapor de água das matrizes GEL/PCL/CS ($\text{g/m}^2/\text{dia}$) reticuladas com GTA a 5% durante 3,5h e não reticuladas com o intervalo [valor médio \pm incerteza] correspondente.

Matriz	WVTR ($\text{g/m}^2/\text{dia}$)
GEL/PCL/CS GTA 5%	1807 ± 417
GEL/PCL/CS	1939 ± 342

Estudos sugerem que a pele normal apresenta taxas de transmissão de vapor de água de $204 \pm 12 \text{ g/m}^2/\text{dia}$, enquanto a pele danificada alcança valores compreendidos entre $278 \pm 26 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ para queimaduras de 1º grau e $5138 \pm 202 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ para queimaduras mais profundas [87], [98].

Os resultados obtidos de WVTR neste trabalho, para a membrana que servirá de substituto dérmico, sugerem que esta é adequada para feridas profundas, entre feridas de 1º grau e feridas profundas com exsudado, pois a média obtida é de $1873 \pm 320 \text{ g/m}^2/\text{dia}$.

Estatisticamente falando, não houve um grande intervalo [valor médio \pm incerteza] nos resultados entre as amostras reticuladas e não reticuladas ($320 \text{ g/m}^2/\text{dia}$), o que significa que a reticulação não altera o WVTR do material.

3.1.1.4.4 Propriedades mecânicas

Para uma melhor caracterização da matriz de GEL/PCL/CS, procedeu-se ao estudo das suas propriedades mecânicas em termos do módulo de Young (E). Este estudo foi realizado em matrizes reticuladas com GTA a 5% durante 3,5h, secas e hidratadas com água destilada. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Módulos de Young da matriz ternária (GEL/PCL/CS), reticulada com glutaraldeído a 5% durante 3,5h, seca e hidratada com o intervalo [valor médio \pm incerteza] correspondente.

Matriz GEL/PCL/CS	E (MPa)
GTA 5%	
Hidratada	8 ± 2
Seca	75 ± 7

Neste trabalho, a matriz de GEL/PCL/CS é constituída com as mesmas concentrações de cada polímero. No entanto, a combinação dos polímeros resulta em propriedades mecânicas diferentes das que estes possuem individualmente.

No estudo das propriedades mecânicas elaborados por Gomes et al., 2015 [3] foram utilizadas matrizes secas e no, caso das matrizes de gelatina, estas foram reticuladas com GTA a 5% durante 5h. Os módulos de Young obtidos para o PCL, CS/PEO e GEL GTA foram de $6,7 \pm 0,4$ MPa, 38 ± 10 MPa e 162 ± 96 MPa, respetivamente.

Os materiais individualmente têm valores de módulo de Young bastante díspares. Por exemplo, o PCL apresenta um módulo de Young bastante inferior ($E=6,7 \pm 0,4$ MPa) e alta ductilidade ($\epsilon=587 \pm 162$ %). No entanto, se se adicionar gelatina, que é caracterizada por uma maior rigidez ($E=162 \pm 96$ MPa) e maior fragilidade ($\epsilon=9 \pm 5$ %) devido à reticulação, haverá um balanço entre os materiais. As propriedades mecânicas de CS/PEO são mais intermédias, tendo valores de 38 ± 10 MPa para o módulo de Young [3].

A combinação de GEL, PCL e CS na matriz ternária, permite obter propriedades mecânicas intermédias, ou seja, uma elasticidade mediana, daí o módulo de Young obtido neste trabalho ser um valor entre os módulos de Young da gelatina e do PCL. Os módulos de Young abrangem valores de 75 ± 7 MPa e 8 ± 2 MPa para matrizes secas e hidratadas, repetivamente.

Relativamente aos resultados obtidos para as matrizes secas, estes estão dentro dos valores esperados, quando comparados com os da literatura. Um módulo de Young de 75 ± 7 MPa é justificado pela combinação dos diferentes polímeros, que apresentam propriedades mecânicas também discrepantes entre si, como já referido anteriormente, tornando a matriz ternária com uma elasticidade e ductilidade “intermédia”.

Para além de se ter efetuado testes de propriedades mecânicas das matrizes secas é crucial fazer o mesmo com matrizes hidratadas, pois enquanto substituto dérmico, as matrizes de GEL/PCL/CS estarão num ambiente húmido. Quando se comparam os resultados obtidos entre as matrizes secas e matrizes hidratadas, é notória a discrepância nos comportamentos mecânicos. As matrizes hidratadas apresentam um módulo de Young cerca de dez vezes inferior ($E = 8 \pm 2$ MPa). Este comportamento é causado pela penetração da água entre as cadeias dos polímeros, que diminui as interações entre as cadeias poliméricas, tornando mais fácil o deslizamento de umas relativamente às outras quando sujeitas a uma força externa.

3.2 Testes *in vitro*

3.2.1 Cultura de células HFFF2

Os testes *in vitro* desenvolvidos neste trabalho pretendem avaliar a viabilidade e morfologia das células semeadas nos diferentes *scaffolds* e condições a estudar. Estes estudos devem ser efetuados antes de serem considerados posteriores testes *in vivo*.

As culturas podem ser realizadas com células primárias ou de linhas celulares. Dado que as células primárias (P1) assemelham-se mais às respostas biológicas *in vivo*, neste trabalho, para além de se terem efetuado testes com a linha celular HFFF2 (com pelo menos uma P9), utilizaram-se também fibroblastos obtidos por explante de biópsias de pele com passagens mais baixas.

Nota: Quando se refere a células semeadas em HA, significa HA+DMEM.

3.2.1.1 Células sob e em ácido hialurónico

De modo a avaliar o impacto da adição de ácido hialurónico ao meio de cultura na capacidade das células aderirem à placa de cultura, procedeu-se à realização da sementeira com 3

condições: células semeadas em DMEM, semeadas sob DMEM+HA e semeadas em DMEM+HA, diretamente nos poços de poliestireno da placa.

Para o estudo da viabilidade celular destas culturas, realizaram-se leituras de absorvância às 24h, para estudar a adesão celular, e às 48h com o intuito de avaliar a proliferação das células.

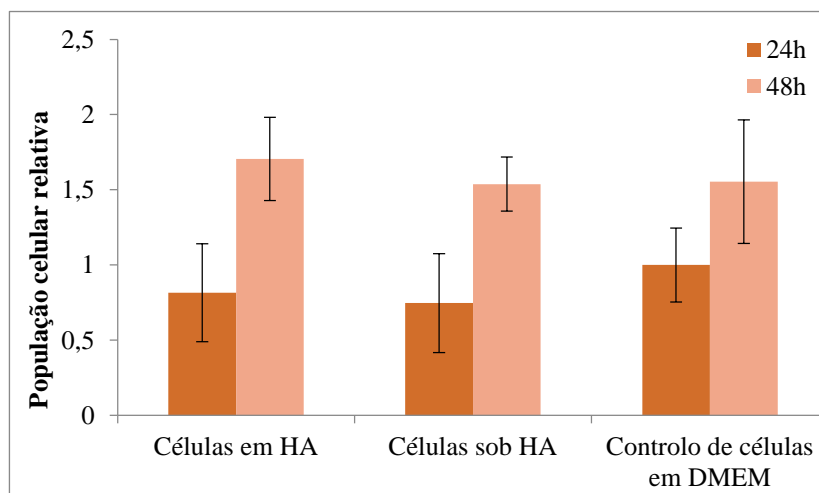


Figura 3.8 - Representação gráfica evidenciando-se a população celular relativa às 24h (adesão) e 48h (proliferação) nas diferentes condições de cultura, nomeadamente células HFFF2 semeadas em HA, semeadas sob HA e controlo de células HFFF2 em DMEM. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].

Os valores de absorvância obtidos foram convertidos para uma percentagem de população celular relativamente ao controlo de células às 24h.

Perante a figura anterior, visualmente as células semeadas em HA aparentam uma maior taxa de adesão (81,6%) e de proliferação (88,8%) celular relativamente às células semeadas sob HA. No entanto, estes resultados foram submetidos ao teste estatístico *Student t* e as duas condições não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) face ao controlo de células em DMEM. Assim, os resultados sugerem que as células aderem e proliferam igualmente nas diferentes condições, concluindo que não existem restrições aquando o uso do HA.

3.2.1.2 Estudo da reticulação com GTA

A reticulação é um processo crucial nas fibras com gelatina, para que seja possível o estabelecimento de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas e consequente estabilização em meio aquoso. Portanto, a matriz ternária (MT) e a gelatina foram submetidas a um *crosslinking* através da deposição por vapor do agente reticulante, o glutaraldeído.

No entanto, devido à sua citotoxicidade, há que ter em consideração alguns parâmetros, de modo a manter a maior viabilidade celular possível. Para tal, neste trabalho efetuaram-se testes com a linha celular HFFF2 de modo a avaliar a influência da concentração do GTA.

Sabendo que o tempo de reticulação também influencia a viabilidade e proliferação celular, é importante ter este parâmetro em consideração. Segundo S. R. Gomes, G. Rodrigues, G. G. Martins, C.M. R. Henriques, & J.C. Silva, 2013 [99] a reticulação com GTA durante 5h é mais eficiente do que durante 2h do ponto de vista da perda de massa das matrizes mas no que diz respeito à adesão celular os resultados foram equivalentes. Deste modo, neste trabalho selecionou-se um tempo intermédio de exposição ao GTA, nomeadamente 3,5h de reticulação.

Devido à citotoxicidade do GTA, é essencial remover o excesso de glutaraldeído presente nas amostras. Estudos revelaram que a imersão das amostras numa solução de glicina tem a capacidade de neutralizar os grupos aldeído não reagidos. Assim sendo, após a reticulação com as diferentes concentrações de GTA (5 wt% e 50 wt%) e após submeter as matrizes a vácuo num exsicador, decidiu-se avaliar o impacto da ausência e da presença de glicina (concentração de 100 mg/ml) nas amostras.

Efetuaram-se culturas de modo a comparar a viabilidade celular nas diferentes concentrações de GTA, a 5% e 50%, sem e com o tratamento com glicina. Os resultados encontram-se nas Figuras 3.7 e 3.8.

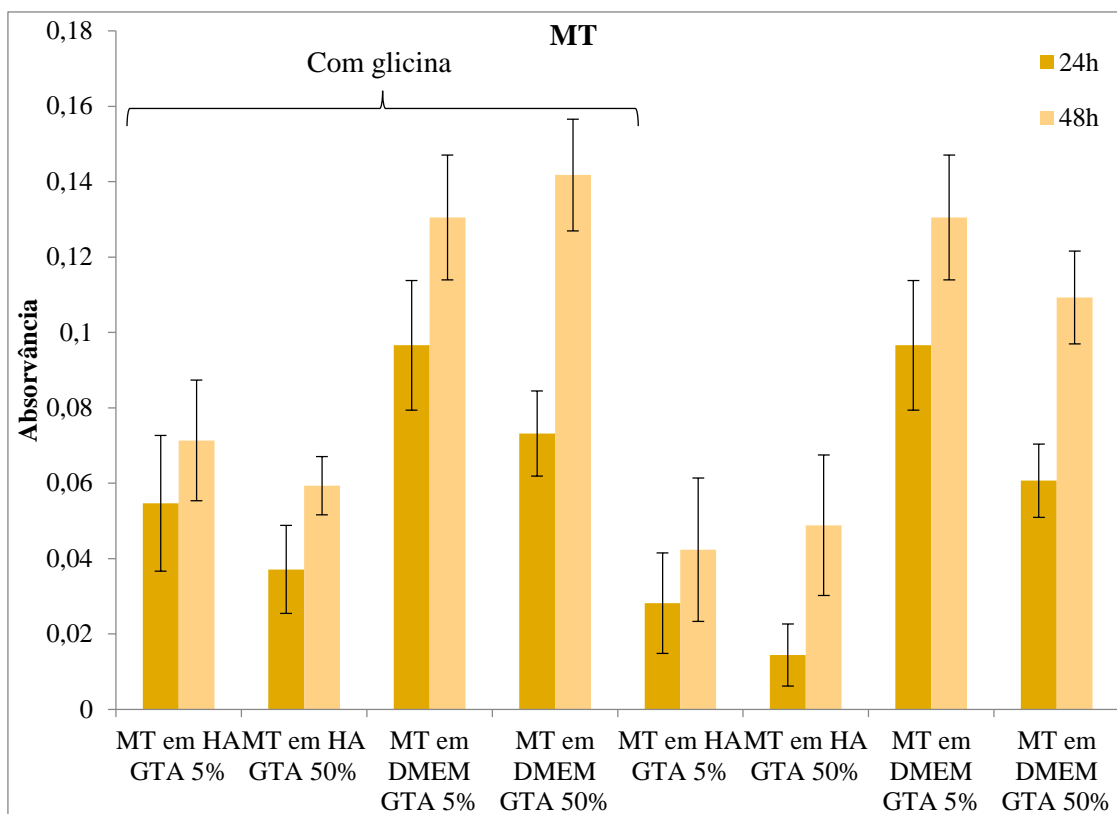


Figura 3.9 - Representação gráfica da média dos valores de absorvância obtidos nas diferentes condições de cultura. Células HFFF2 semeadas em HA, na MT e reticulada com GTA a 5 e 50% com e sem a adição de glicina, indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].

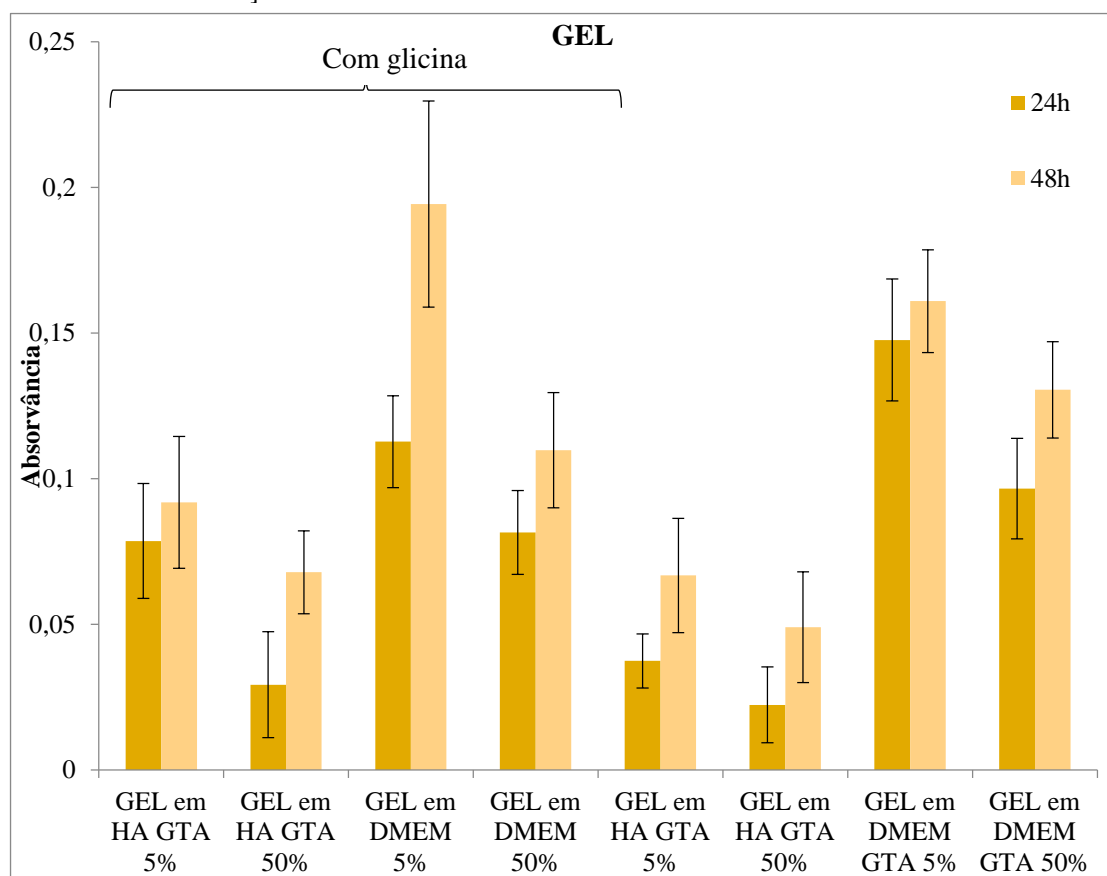


Figura 3.10 - Representação gráfica da média dos valores de absorvância obtidos nas diferentes condições de cultura. Células HFFF2 semeadas em HA, em GEL e reticulada com GTA a 5 e 50% com e sem a adição de glicina, indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].

Analisando as figuras anteriores, é evidente alguma diferença de resultados entre as células que foram semeadas em matrizes reticuladas com GTA a 5 % e semeadas em matrizes reticuladas com GTA a 50%.

Constata-se que a reticulação com uma menor concentração de GTA torna-se menos citotóxica do que com GTA a 50%, havendo uma maior adesão e proliferação celular com GTA a 5%, tal como era expectável. É normal obter estes resultados, dado que uma concentração mínima de GTA já é suficiente para reticular as amostras, tal como se constatou nos resultados obtidos por A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini, & N. Roveri, 2001 [79], em que GTA a 1% (24h à temperatura ambiente) é suficiente para obter um grau de reticulação perto dos 100%. Além disso, é natural também que quanto mais GTA estiver presente, mais tóxico se torna para as células, daí haver uma melhor adesão e proliferação com GTA a 5%.

Com o potencial de remover o excesso de GTA nas amostras, seria de esperar que o tratamento com glicina melhorasse a adesão e proliferação celular. De facto, apesar de não ser demasiado notório e de não ser sempre constante, existe um aumento dos valores de absorvância, sugerindo que houve um acréscimo da taxa de adesão e proliferação de uma forma geral.

Ao analisar mais detalhadamente, é evidente, por exemplo, que a sementeira na matriz ternária (GEL/PCL/CS) em ácido hialurónico (HA) com a presença de glicina apresenta um aumento da sua taxa de adesão e proliferação (aproximadamente 40%) quando comparada com a ausência de glicina.

No entanto, nem sempre se evidencia este aumento. Se olharmos para os valores de absorvância das células semeadas na MT em DMEM com reticulação prévia com GTA a 5%, é notório que a presença da glicina em nada influencia a sementeira. Além disso, houve uma condição em que a presença de glicina diminuiu os valores de absorvância, nomeadamente na sementeira em GEL embebida em DMEM. Esta diminuição pode ser justificada pelo fato de não ter sido semeado o mesmo número de células que era pretendido. Estes pequenos erros experimentais podem ocorrer devido ao facto das culturas não serem realizadas ao mesmo tempo, o que pode influenciar as condições de cultura. Estas discrepâncias de valores também se podem dever à incorreta pipetagem da resazurina ou mesmo à incorreta pipetagem de volume de amostra para posterior leitura das absorvâncias.

De qualquer modo, em grande parte das condições, a adição de glicina potencializa uma maior taxa de adesão e proliferação. Assim, as culturas realizadas no seguimento deste trabalho foram efetuadas com um tratamento prévio com glicina e com uma reticulação com GTA a 5%.

3.2.1.3 Cultura em DMEM e em ácido hialurónico

Após terem sido estudadas quais as condições adequadas para o método de reticulação e tratamento após a reticulação das matrizes com gelatina, procedeu-se a nova cultura de fibroblastos HFFF2. Nesta sementeira pretendeu-se analisar a biocompatibilidade e a habilidade de promover a adesão e proliferação das células dos diferentes materiais que compõem a matriz ternária, nomeadamente, a GEL, o PCL e o CS. A sementeira nestes materiais foi realizada com duas condições de cultura, designadamente nos dois diferentes meios de cultura, DMEM e HA, havendo sempre uma condição de controlo de células (CC) semeada diretamente na placa de 24 poços.

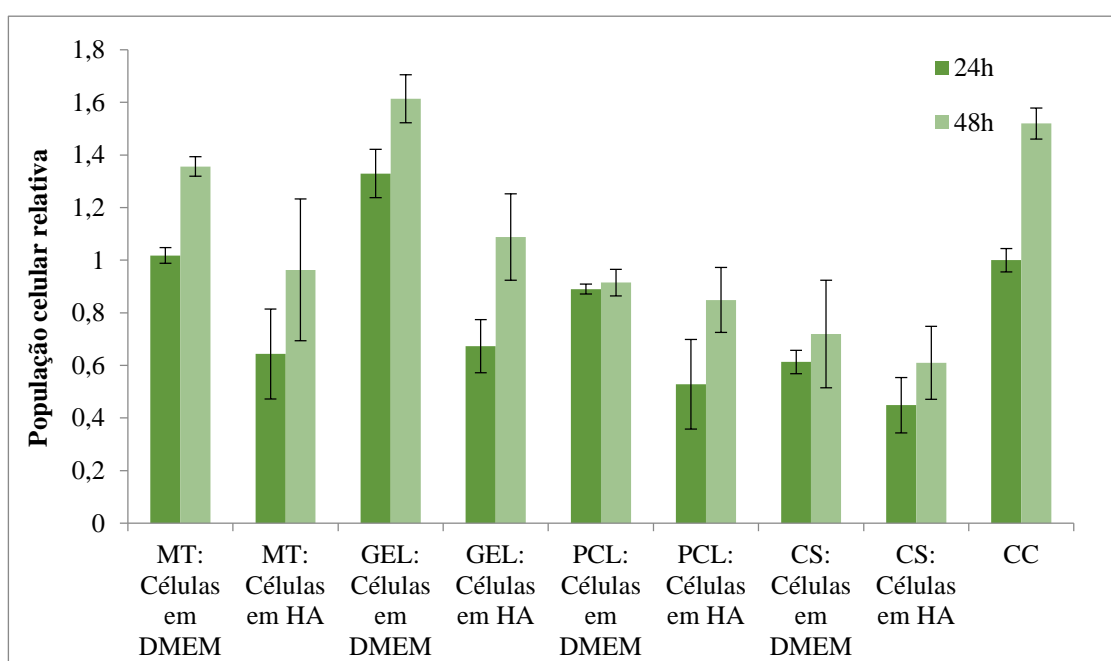


Figura 3.11 - Representação gráfica da população celular relativa das HFFF2 nas diferentes condições de cultura. Células semeadas em HA, nos diferentes materiais, nomeadamente na MT, GEL, PCL e CS, bem como o controlo de células, indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].

No primeiro dia de cultura, foi efetuado o teste de viabilidade celular que forneceu informação quanto à adesão das células nos diferentes materiais, relativamente ao controlo de células. A maior taxa de adesão observou-se na gelatina em DMEM, com uma taxa de adesão 33% superior à do controlo de células. É possível ainda constatar que houve diferenças nas taxas de adesão quando as células se encontram em meios diferentes. Por exemplo, as células semeadas na matriz de gelatina aderiram a uma maior taxa em DMEM do que em HA. Este comportamento discrepante também ocorre nos outros materiais, sugerindo que a linha celular tem uma maior

facilidade de aderir às matrizes quando é semeada com o meio DMEM. Porém, devido ao método de avaliação da população celular com resazurina, um factor de cariz experimental pode ajudar a explicar estes resultados. A solução de resazurina é adicionada ao meio de cultura em que foi efectuada a sementeira. A mistura e homogeneização das duas soluções não é fácil de efectuar no volume reduzido do poço e de modo a não perturbar e eventualmente comprometer a adesão e viabilidade das células. Acresce que a presença do ácido hialurónico pode dificultar a difusão tanto da resazurina quanto da resorufina e o meio que é retirado da cultura para a leitura da absorvância não traduzir, por isso, a metabolização da resazurina pelas células presentes na cultura.

A seguir à gelatina, o material com a maior taxa de adesão foi a matriz ternária (GEL/PCL/CS), com uma taxa de adesão de 83% das células semeadas inicialmente.

As matrizes constituídas por PCL e CS potenciaram taxas de adesão inferiores, apresentando taxas de 80% e 53%, respetivamente. A menor adesão das células ao PCL pode ser justificada pela natureza hidrofóbica do polímero e pelos poucos locais de superfície reativos disponíveis para interações celulares. Sendo o quitosano um polímero catiónico, seria de esperar que interagisse favoravelmente com as cargas negativas da membrana celular, promovendo assim a adesão celular. No entanto, neste trabalho tal comportamento não se verificou, provavelmente devido à protonação dos grupos amina não ser significativa ao pH do meio de cultura [3].

Quanto à proliferação celular, as células proliferaram do primeiro para o segundo dia em todos os substratos.

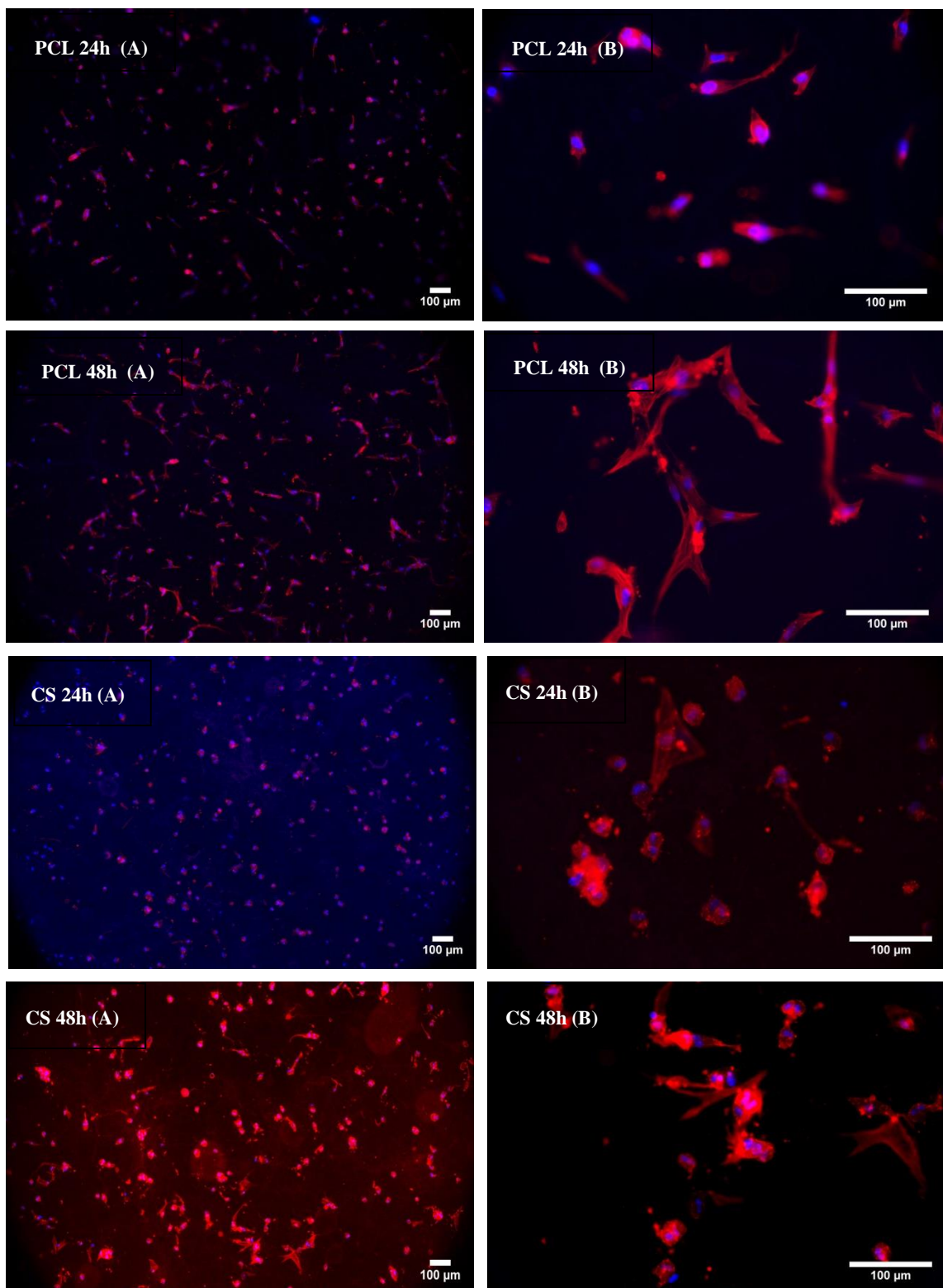
Como era de prever, o controlo de células obteve um maior crescimento celular relativamente ao primeiro dia de cultura, cerca de 52% de aumento da população. No caso da MT e GEL, as células proliferaram respetivamente, 33% e 35%. Já no PCL e CS, as células não conseguiram proliferar a uma taxa tão satisfatória, proliferando apenas 17,3% e 13,4%, respetivamente.

A etapa seguinte consistiu na observação, por microscopia de fluorescência, dos diferentes substratos onde foram semeadas as células HFFF2.

3.2.1.4 Microscopia de fluorescência

Neste trabalho recorreu-se à técnica de fluorescência de modo a observar a morfologia das células e avaliar a densidade celular nas matrizes unitárias, PCL, CS e GEL, que constitui o substituto dérmico desenvolvido (MT: GEL/PCL/CS).

A microscopia de fluorescência permitiu observar o núcleo e o citoesqueleto das células, que correspondem às principais estruturas da célula. No entanto, a observação do citoesqueleto das células semeadas na gelatina não foi exequível, devido à elevada autofluorescência da matriz.



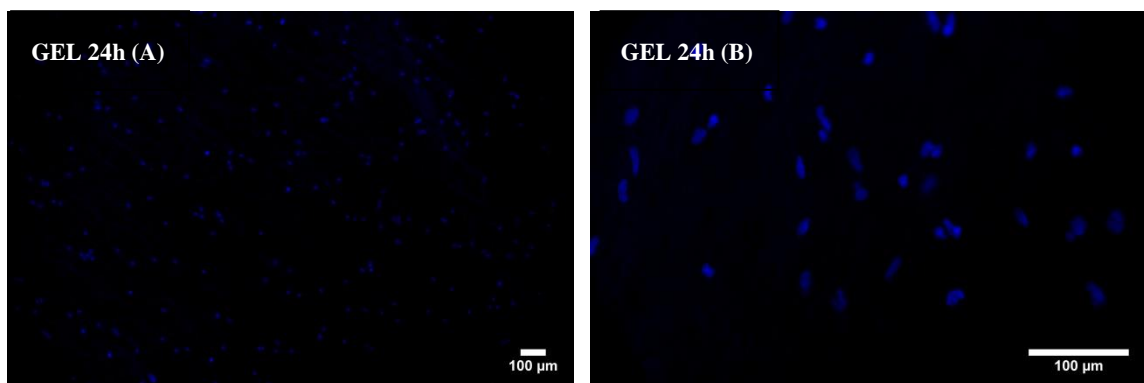


Figura 3.12 - Imagens de microscopia de fluorescência sobrepostas (à exceção da gelatina) das células HFFF2 semeadas em DMEM nas diferentes matrizes unitárias, nomeadamente em PCL, CS e GEL, com 4 dias de cultura. Para cada matriz foram tiradas quatro imagens de fluorescência, duas para cada tempo de cultura (em que foram realizadas as leituras de absorvância) (24h e 48h) e para cada tempo foram tiradas duas, uma com uma ampliação de 100x (A) e outra com uma ampliação de 400x (B).

Na generalidade, a nível da densidade celular verifica-se uma maior abundância das HFFF2 às 48h do que às 24h, o que é expectável, dado que às 24h apenas ocorre a adesão celular e só a partir das 48h é que se verifica a sua proliferação.

Analisando as imagens com ampliação de 40x, verifica-se que as HFFF2 semeadas em PCL apresentaram uma morfologia fusiforme e alongada, morfologia característica dos fibroblastos. Já as células semeadas em CS apresentam, mesmo após 48h, uma morfologia mais retraída e esférica, sendo poucas as células que apresentam a morfologia fibroblástica típica o que é indicativo da dificuldade que as células têm em aderir ao CS.

3.3 Componente epidérmica e Bicamada (componente dérmica e epidérmica)

3.3.1 Produção e caracterização

3.3.1.1 Matrizes de PVP/CS – Componente Epidérmica

3.3.1.1.1 Morfologia

As soluções de PVP/CS foram preparadas com 2% de PVP, 2% de CS e 0,2% de PEO em 80% de AA, 12% de água ultra pura e 4% de etanol absoluto.

Referente à matriz de PVP/CS, uma das etapas neste trabalho passa por encontrar o melhor tempo de irradiação para reticular as amostras. Para tal acontecer é conveniente caraterizar a morfologia das fibras nos diferentes tempos de irradiação através do SEM.

- PVP/CS sem irradiação

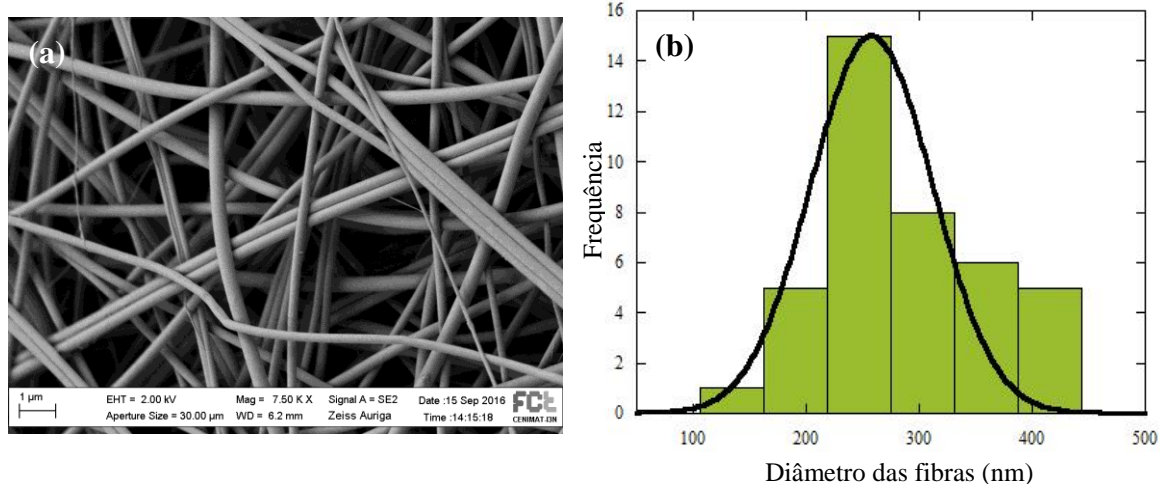


Figura 3.13 - Imagem obtida por SEM (a) e histograma com os diâmetros obtidos (b) da matriz PVP/CS sem irradiação.

- PVP/CS com 15 minutos

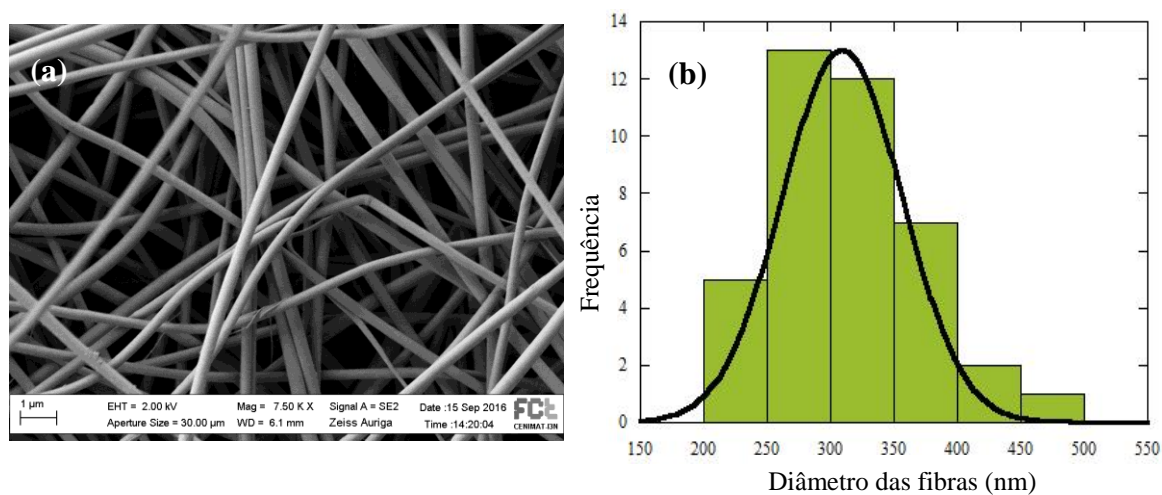


Figura 3.14 - Imagem obtida por SEM (a) e histograma com os diâmetros obtidos (b) da matriz PVP/CS com 15 minutos de irradiação.

- PVP/CS com 60 minutos de irradiação

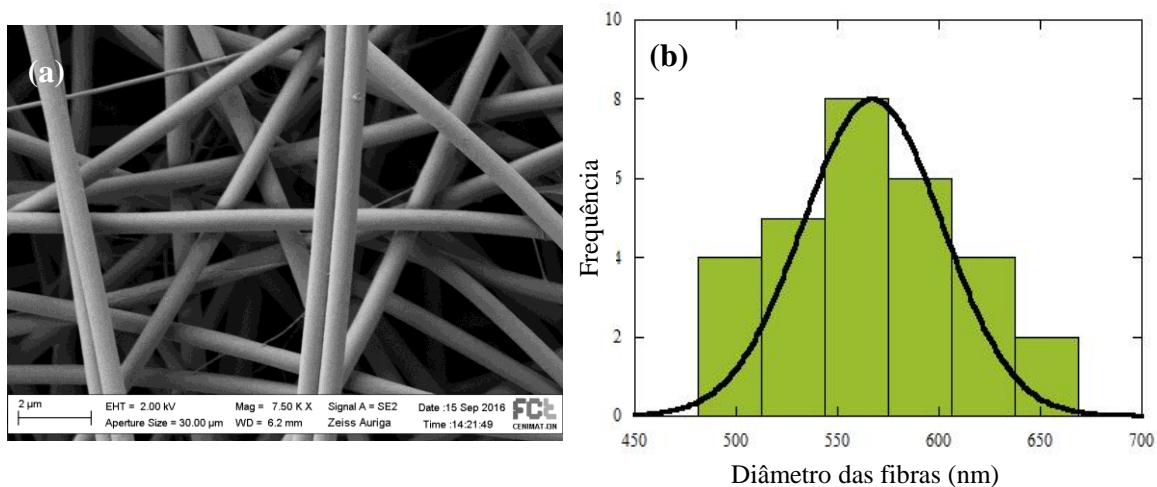


Figura 3.15 - Imagem obtida por SEM (a) e histograma com os diâmetros obtidos (b) da matriz PVP/CS com 60 minutos de irradiação.

- PVP/CS com 600 minutos de irradiação

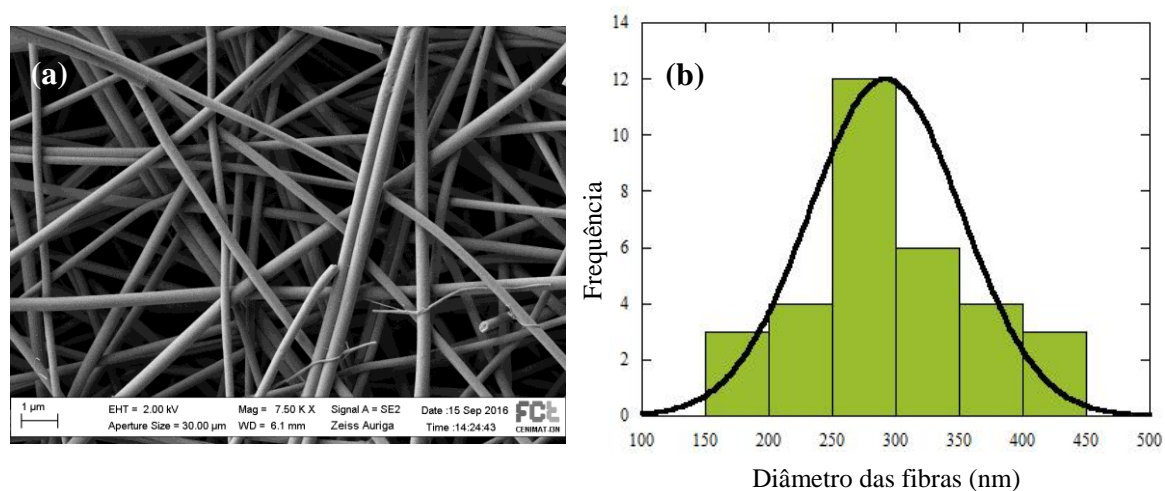


Figura 3.16 - Imagem obtida por SEM (a) e histograma com os diâmetros obtidos (b) da matriz PVP/CS com 600 minutos de irradiação.

Tabela 3.7 - Diâmetros médios das fibras e desvios padrões (nm) das matrizes de PVP/CS sem irradiação e de PVP/CS com diferentes tempos de irradiação, nomeadamente 15, 60 e 600 minutos.

	Diâmetro médio das fibras (nm)	Desvio padrão (nm)
PVP/CS sem irradiação	285	68
PVP/CS com 15 min de irradiação	314	59
PVP/CS com 60 min de irradiação	567	49
PVP/CS com 600 min de irradiação	294	64

As matrizes de PVP/CS com e sem irradiação indicaram uma morfologia uniforme nas suas fibras, sem evidência de pontos de fusão, nem porosidade ou defeitos, embora seja visível uma fibra quebrada na matriz de PVP/CS com 600 minutos de irradiação (Figura 3.14 (a)).

A partir da Tabela 3.7 é possível constatar que os diâmetros são diferentes consoante os tempos de irradiação, no entanto, as diferenças não são estatisticamente significativas.

3.3.1.1.2 ATR-FTIR

Neste trabalho, a análise por FTIR tem como finalidade analisar a composição química da matriz PVP/CS quando esta é irradiada durante diferentes tempos, através dos modos vibracionais das moléculas. Para examinar se existem alterações na estrutura das moléculas, analisaram-se também amostras padrão (filmes) de cada polímero constituinte da matriz, como termo de comparação.

Analisando o espectro de FTIR, consegue-se aferir quanto às bandas e picos característicos de cada polímero.

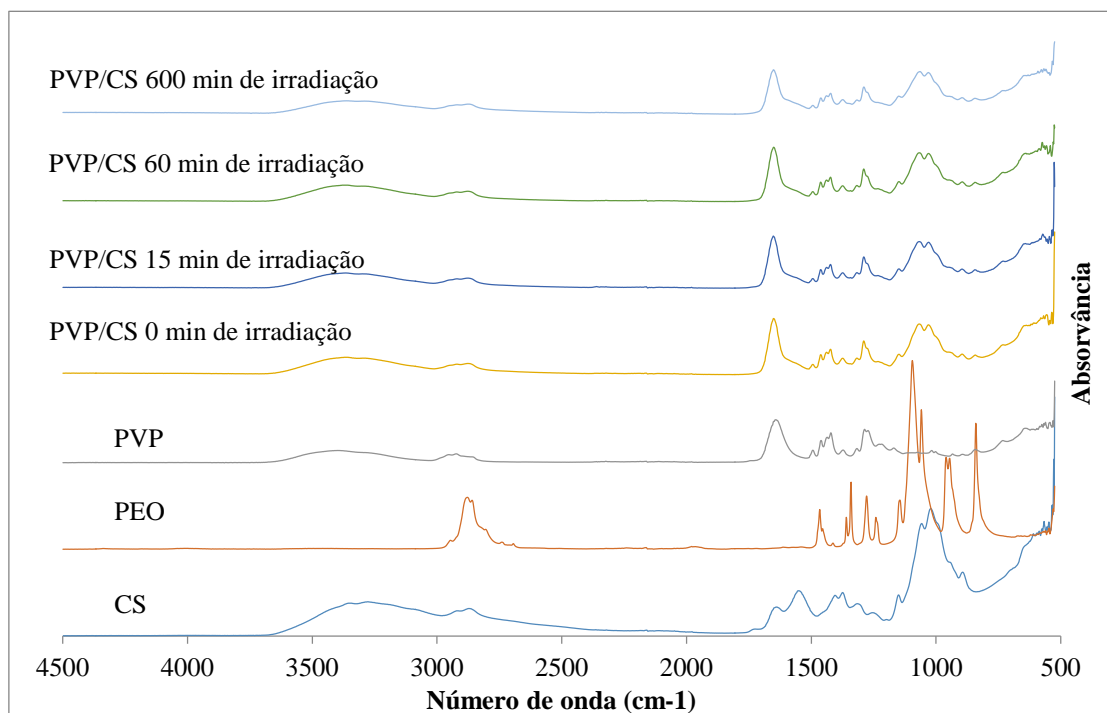


Figura 3.17 - Espectros de FTIR-ATR das matrizes de PVP/CS sem irradiação e com irradiação a diferentes tempos, nomeadamente 0, 15, 60 e 600 minutos e espectros dos filmes de CS, PEO e PVP.

Tabela 3.8 - Bandas IR (cm^{-1}) obtidas através do espectro FTIR-ATR (Figura 3.15) correspondente a cada polímero usado, CS, PEO e PVP.

Polímero padrão	Banda IR (cm^{-1})
CS	3750-3000; 2950-2800; 1645; 1574; 1426; 1375; 1000
PEO	2900-2890; 1470; 1340; 1360; 1140; 1100; 1060; 957; 955
PVP	3600-3100; 2980-2860; 1650; 1500; 1460; 1420; 1380; 1280; 732

Do CS encontra-se a banda entre $3750\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a vibrações de estiramento das ligações dos grupos N-H e O-H, a banda situada entre $2950\text{ e }2800\text{ cm}^{-1}$ e os picos 1426 cm^{-1} e 1375 cm^{-1} característicos do estiramento das ligações simétricas e assimétricas C-H, o pico a 1645 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo C=O (amida I), a 1574 cm^{-1} a deformação angular da amina primária e banda amida II. A absorção entre 1160 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} ,

característica da estrutura sacarídea do CS, é atribuída às vibrações de estiramento da ligação C-O do anel polissacárido e da ligação glicosídica -C-O-C-.

Do PEO observa-se a banda compreendida entre 2900 cm^{-1} e 2890 cm^{-1} e os picos 1470 cm^{-1} , 957 cm^{-1} e 955 cm^{-1} que coincidem com as vibrações de estiramento do metileno ($-\text{CH}_2$) e os picos 1340 cm^{-1} e 1360 cm^{-1} que correspondem ao $-\text{CH}_2$. Encontra-se ainda no PEO, a absorção a 1140 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} correspondentes ao estiramento das ligações do complexo -C-O-C-, que consiste nestes 3 picos facilmente distinguíveis próximos entre si.

Do PVP é possível verificar diferentes modos vibracionais, nomeadamente, a banda compreendida entre 3600 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} , que apesar de ténue, corresponde ao estiramento das vibrações do grupo $-\text{OH}$, a banda entre 2980 cm^{-1} e 2860 cm^{-1} , não muito acentuada que coincide com as vibrações de estiramento do grupo $-\text{CH}-$ e $-\text{CH}_2$, o pico 1650 cm^{-1} que corresponde à contribuição das vibrações de estiramento dos grupos $\text{C}=\text{O}$, os picos 1500 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} que coincidem à deformação do CH dos grupos cíclicos CH_2 e os picos 1280 cm^{-1} e 732 cm^{-1} que correspondem ao estiramento das ligações da amida (C-N).

Após a observação dos picos principais característicos de cada polímero padrão, compararam-se estes picos com os picos obtidos para as matrizes de PVP/CS irradiadas a diferentes tempos. Os picos característicos do PEO não se encontram presentes. No entanto, verifica-se a presença de modos vibracionais típicos do CS e PVP.

Do CS observam-se as bandas compreendidas entre $3750\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, $2950\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ e a banda em torno de 1000 cm^{-1} . Do PVP observa-se a presença dos picos a 1650 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} e 1280 cm^{-1} . Assim, é possível constatar que as matrizes irradiadas apresentaram todos os modos vibracionais principais do PVP e alguns do CS.

Comparando as 4 matrizes de PVP/CS, parece que o tempo de irradiação em nada influenciou a sua estrutura química. A irradiação tem como objetivo tornar a matriz insolúvel e à partida, algumas alterações na sua estrutura química deveriam-se destacar. No entanto, como não se observam alterações, significa que a irradiação terá dado origem a ligações de tipo previamente existentes na cadeia polimérica, daí não se ter evidenciado alterações nos picos obtidos por FTIR.

3.3.1.1.3 DSC/TGA da componente epidérmica

Através da análise por DSC, concluiu-se que as amostras de PVP/CS com diferentes tempos de irradiação não obtiveram pontos de fusão discrepantes entre si. Os pontos de fusão obtidos foram de 60°C , 60°C , $60,7^\circ\text{C}$ e $60,8^\circ\text{C}$ para PVP/CS irradiados com 0, 15, 60 e 600 minutos,

respetivamente. Estas T_m corresponderam à temperatura de fusão do PEO, que se encontra presente nas amostras, embora a baixas percentagens, correspondendo a apenas 1:10 da solução polimérica. Estes resultados relativos ao substituto epidérmico sugerem que o tempo de irradiação aparentemente não altera as propriedades físicas das matrizes.

Segue-se o termograma correspondente ao PVP/CS sem irradiação (os restantes termogramas correspondentes aos outros tempos de irradiação encontram-se em Anexo).

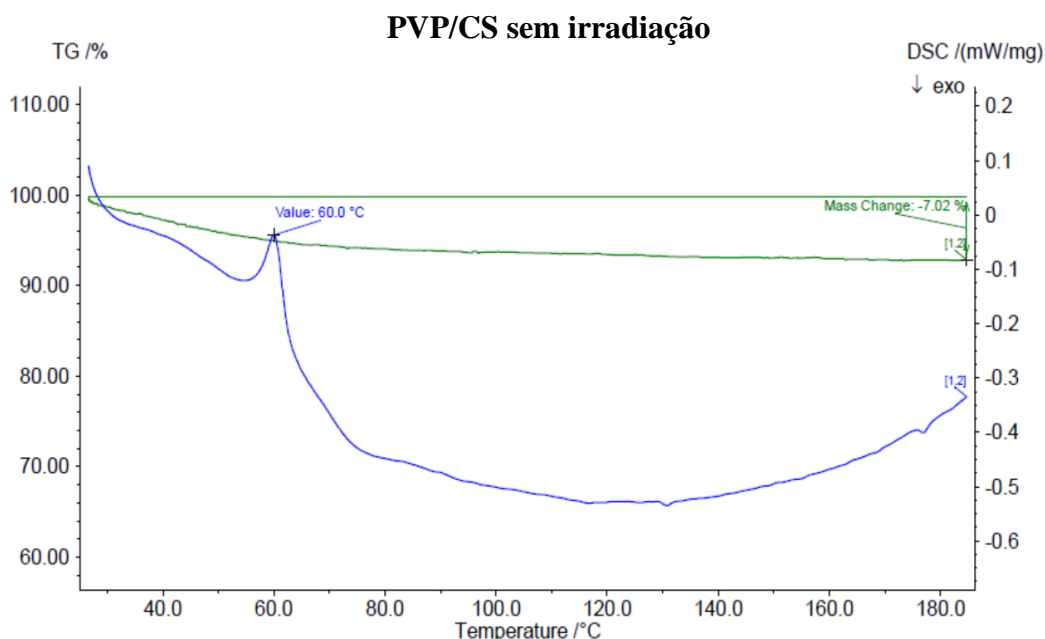


Figura 3.18 - Termograma obtido por DSC do PVP/CS sem irradiação, evidenciando-se uma temperatura de fusão correspondente ao PEO presente na amostra (60°C). Verificou-se uma perda de massa cerca de 7,02%.

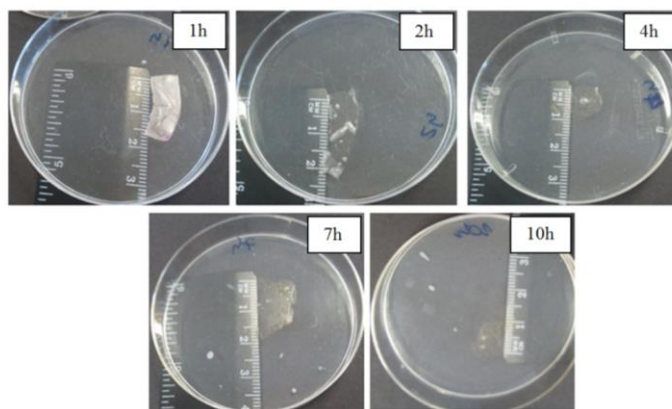
Assim conclui-se que as componentes dérmica e epidérmica não apresentam pontos de fusão inferiores a 37°C, sendo adequadas para aplicação em seres vivos.

3.3.1.1.4 Testes de perda de massa

Como já referido anteriormente, o PVP necessita de um processo de reticulação, de modo a diminuir a fração solúvel. Deste modo, irradiaram-se as amostras com luz UV. No entanto, para concluir qual o tempo de irradiação mais adequado à membrana de PVP/CS, efetuaram-se testes de perda de massa com tempos de irradiação diferentes.

Inicialmente, os testes de perda de massa foram executados com tempos de irradiação alargados, nomeadamente 1, 2, 4, 7 e 10h.

(a)



(b)

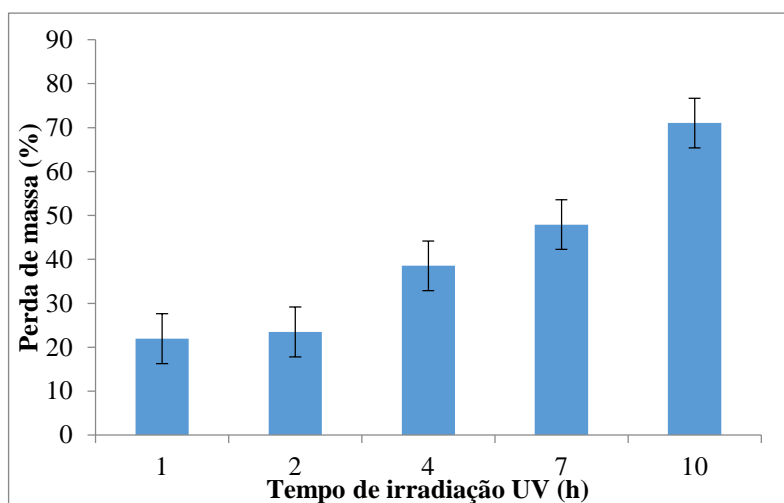


Figura 3.19 - Matriz PVP/CS após 1, 2, 4, 7 e 10h de irradiação com luz UV e posterior imersão em água destilada (a). Perda de massa da matriz (%) em função dos diferentes tempos de irradiação por luz UV, após a sua hidratação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza] (b).

Conforme se verifica na figura anterior, quanto maior o tempo de irradiação a que as fibras estiveram sujeitas, maior será a sua degradação. Dado que o pretendido é que haja uma menor perda de massa das fibras, de modo a que estas não sejam degradadas quando entram em contacto com um ambiente húmido, optou-se por um tempo de irradiação menor.

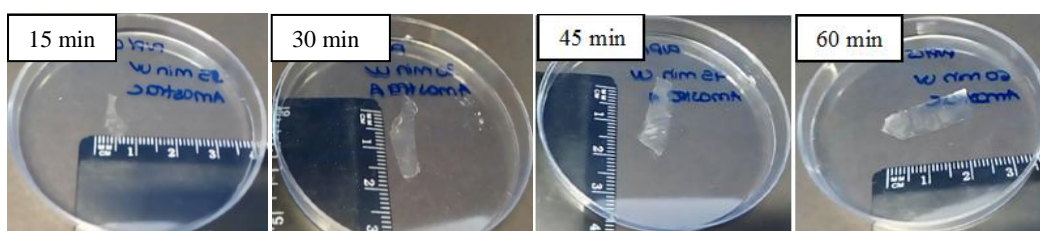
Comparando o gráfico de perda de massa das fibras com as imagens correspondentes, consegue-se aferir relativamente à degradação das mesmas. Na primeira hora de irradiação por UV, a fibra consegue-se manter intacta e apresenta menor taxa de degradação e portanto menor perda de massa.

Com o aumento do tempo de irradiação, as fibras vão-se dissolvendo, ficando cada vez menos nítidas, o que significa que existe um aumento da perda de massa e consequentemente um aumento da degradação. Estes resultados tornam-se assim consistentes de acordo com estu-

dos elaborados por A. Sionkowska, M. Wisniewski, J. Skopinska, S. Vicini, & E. Marsano, 2005 [84], que concluem que com o aumento do tempo de irradiação as matrizes tornam-se mais solúveis.

Como a 1 hora de irradiação as fibras obtiveram uma menor perda de massa e se mantiveram intactas, passou-se a irradiar as fibras com este tempo. No entanto, efetuaram-se testes de perda de massa com tempos de irradiação inferiores, nomeadamente 15, 30, 45 e 60 minutos, de modo a concluir qual o tempo de irradiação ideal.

(a)



(b)

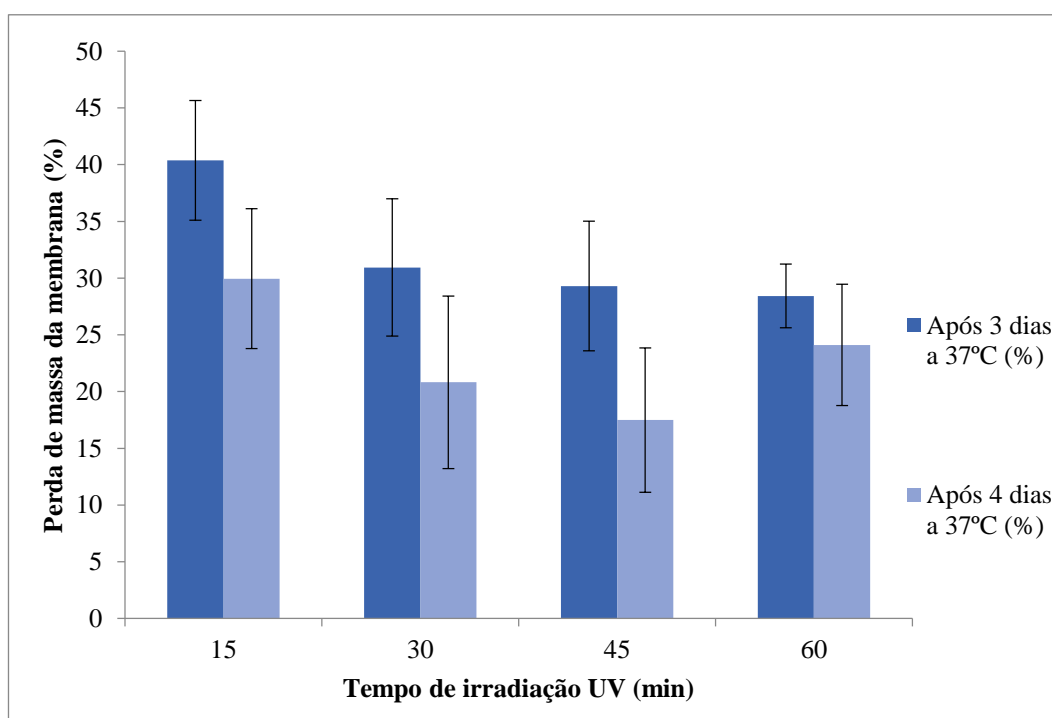


Figura 3.20 - Matriz de PVP/CS após 15, 30, 45 e 60 min de irradiação com luz UV e posterior imersão em água destilada (a). Perda de massa da matriz (%) em função dos diferentes tempos de irradiação por luz UV, após a sua hidratação e após 3 e 4 dias de secagem na estufa a 37°C. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza] (b).

Tabela 3.9 - Resultados das médias de perda de massa (%) com o valor médio \pm incerteza para cada tempo de irradiação por luz UV (15, 30, 45 e 60 minutos).

Tempo de irradiação UV (min)	Média da perda de massa da membrana (%)
15	$35,2 \pm 5,7$
30	$25,9 \pm 6,8$
45	$23,4 \pm 6$
60	$26,3 \pm 4$

Como se observa na Figura 3.20 (a), concluir relativamente à aparência das fibras que foram irradiadas a diferentes tempos de irradiação não é facilmente visível. No entanto, consegue-se visualizar que houve uma parcial dissolução do material quando se compara 15 min de irradiação com 60 min. A 60 min de irradiação, a fibra permanece intacta, enquanto a 15 min de irradiação a membrana não é suficientemente reticulada e apresenta uma maior perda de massa.

Para concluir relativamente às especulações acima referidas, os testes de perda de massa foram realizados, pesando as amostras após 3 e 4 dias. Verificou-se uma diminuição da perda de massa dos 3 para os 5 dias de secagem a 37°C, como se pode constatar através da Figura 3.20 (b).

Aos 15 minutos de irradiação, a matriz apresentou resultados de perda de massa mais elevados, como se pode verificar pela média determinada na Tabela 3.9. O que significa que a membrana não sofre um processo de reticulação suficientemente eficaz para insolubilizar a sua fracção solúvel com apenas 15 minutos de irradiação por luz UV.

Descartando os 15 minutos de irradiação para a matriz de PVP/CS, segue-se os tempos de irradiação de 30 e 45 minutos. Aos 30 minutos, a membrana já consegue obter valores mais baixos de perda de massa, valores estes que são muito semelhantes aos 45 e 60 minutos de irradiação. Ou seja, a partir dos 30 minutos o tempo de irradiação já começa a ser mais eficaz.

Tendo em conta os 30, 45 e 60 minutos de irradiação, não existem diferenças significativas entre estes tempos de irradiação. Estatisticamente falando, de facto a escolha entre estes três tempos possivelmente não iria influenciar a eficácia do processo de reticulação da matriz, tendo em conta a análise dos valores de perda de massa e os desvios padrões correspondentes.

Contudo, tendo em conta a literatura foi feita a seleção do tempo de irradiação de 60 minutos, por ser um tempo razoável para converter a parte solúvel da amostra em fracção insolúvel

e também por ser um dos tempos utilizados por investigadores. Aliás, os testes elaborados pela maioria dos investigadores, são feitos com maiores intervalos de tempo de irradiação, daí esta escolha [84], [100].

3.3.1.1.5 Taxa de Transmissão de Vapor de Água (WVTR)

Neste trabalho, a membrana constituída por PVP/CS simula o efeito protetor da epiderme, e tal como na matriz ternária (GEL/PCL/CS) efetuaram-se testes de transmissão de vapor de água, de modo a aferir em que condições clínicas esta matriz é aplicável.

Os resultados obtidos para as taxas de transmissão de vapor de água para as diferentes matrizes de PVP/CS, encontram-se na Tabela 3.10. A média da WVTR para esta matriz é de 1713 ± 130 g/m²/dia e 1728 ± 303 g/m²/dia para a matriz irradiada com luz UV durante 60 minutos e não irradiada, respetivamente. A diferença de valores entre a matriz irradiada e não irradiada não foi estatisticamente significativa.

As taxas de transmissão de vapor de água obtidas demonstraram-se semelhantes às taxas da matriz GEL/PCL/CS, sugerindo que ambas as membranas são propícias a serem utilizadas para o mesmo tipo de feridas cutâneas, mais precisamente para feridas profundas, dado que os valores de WVTR obtidos são compreendidos entre 278 ± 26 e 5138 ± 202 g/m²/dia [87], [93].

Tabela 3.10 - Taxas de transmissão de vapor de água das matrizes PVP/CS irradiadas com luz UV e não irradiadas, indicando o intervalo [valor médio \pm incerteza].

Matriz	WVTR (g/m²/dia)
PVP/CS 1h irradiação UV	1713 ± 130
PVP/CS	1728 ± 303

3.3.1.1.6 Propriedades mecânicas

Tal como na matriz ternária, procedeu-se à caracterização das propriedades mecânicas da matriz binária PVP/CS em termos do módulo de Young (*E*).

Após a escolha da hora de irradiação por luz UV, os estudos do módulo de Young foram efetuados com matrizes irradiadas 1h, secas e hidratadas com água destilada. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.11.

Tabela 3.11 - Módulos de Young da matriz PVP/CS irradiada com luz UV durante 1h, seca e hidratada, indicando o intervalo [valor médio \pm incerteza].

Matriz PVP/CS	<i>E</i> (MPa)
1h irradiação UV	
Hidratada	$2,0 \pm 0,2$
Seca	72 ± 15

Segundo resultados obtidos por Gomes et al., 2015 [3], as matrizes secas compostas por quitosano (CS) apresentam valores de módulo de Young de 38 ± 10 MPa, que quando comparados com outros polímeros, tais como gelatina e PCL, apresentam propriedades mecânicas intermédias. No entanto, tal como é de esperar, e como acontece com a gelatina, as matrizes de CS quando são hidratadas diminuem substancialmente o seu módulo de Young.

As matrizes produzidas neste trabalho são constituídas por igual proporção dos polímeros PVP e CS, nomeadamente numa proporção de 50:50.

Estudos constataram que o módulo de Young dos dois polímeros aumenta após irradiação. Após 2h de irradiação, estas mudanças são mais evidentes do que quando os polímeros são submetidos a menores tempos de irradiação. Estas mudanças são mais evidentes nas amostras de quitosano, o que indica que este polímero é menos resistente à irradiação do que o PVP [84].

A mistura PVP/CS apresenta uma menor resistência à tração, menor elongação e maior módulo de Young do que as amostras de quitosano [84]. Tal se evidenciou neste trabalho, dado que as amostras de PVP/CS secas produzidas neste trabalho apresentaram um módulo de Young de 72 ± 15 MPa, ou seja, um módulo de Young maior do que nas amostras de CS ($E = 38 \pm 10$ MPa).

Quando existe uma maior predominância do PVP nas amostras de PVP/CS, não existem tantas mudanças nas propriedades mecânicas. O contrário acontece quando existe mais quitosano nas amostras. Estas alterações sugerem que o PVP restringe a transformação fotoquímica do quitosano [84].

Neste trabalho a predominância dos dois polímeros foram as mesmas, sugerindo que não existe excesso de PVP suficiente para limitar a transformação fotoquímica do quitosano.

Quando as matrizes de PVP/CS são hidratadas com água destilada, existe uma descida brusca do módulo de Young, apresentando um módulo de Young de apenas $2,0 \pm 0,2$ MPa, indicando uma muito baixa rigidez do material. Este comportamento é fundamentado pela penetração da água entre as cadeias dos polímeros, que potencializa o deslizamento destas umas relativamente às outras quando é aplicada uma força externa.

3.3.2 Testes *in vitro*

3.3.2.1 Cultura de células HFFF2 e Fibroblastos extraídos de biópsias de pele

Um dos objetivos deste trabalho passa pela realização de uma cultura em bicamada, como já foi descrito no capítulo Materiais e Métodos, e para tal, inicialmente efetuaram-se culturas com apenas um substrato, de modo a comparar a adesão e proliferação celular das HFFF2 e células extraídas de biópsias de pele às matrizes ternária e binária, nomeadamente MT e PVP/CS, respetivamente.

Após várias tentativas de isolar as células fibroblásticas por métodos enzimáticos, através de diferentes procedimentos, chegou-se à conclusão que a forma mais eficaz de isolá-las foi a partir de explantes.

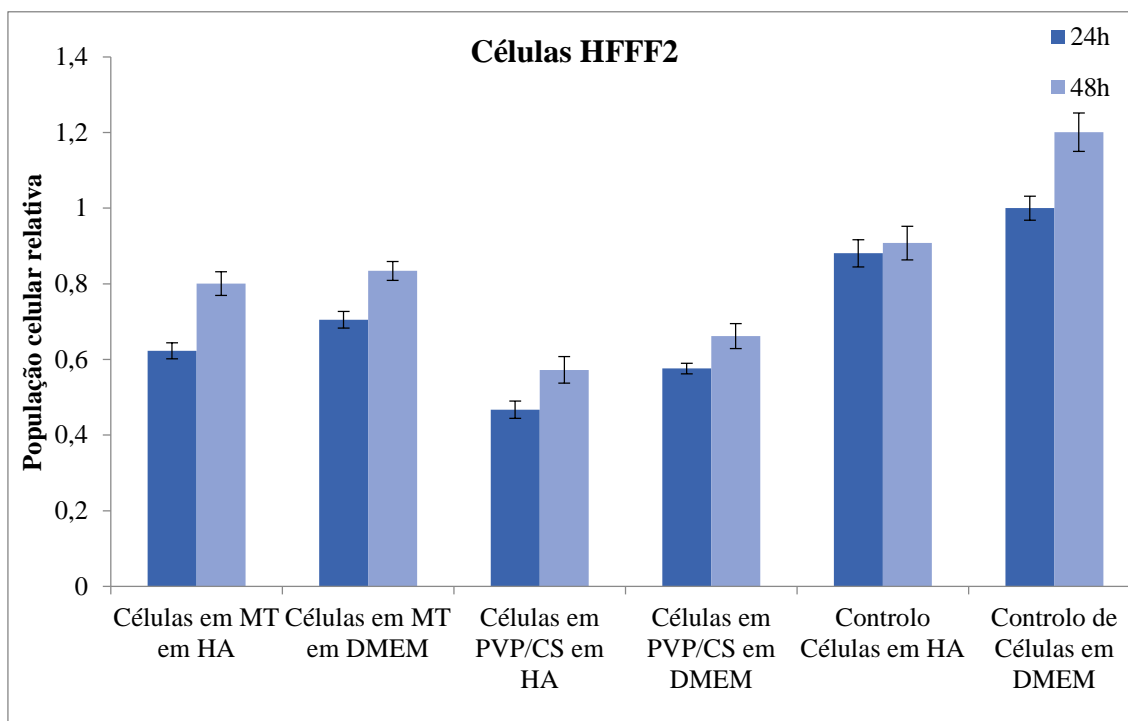


Figura 3.21 - Representação gráfica da população celular relativa das células HFFF2 nas diferentes condições de cultura. Células semeadas em DMEM e HA, nos diferentes materiais, nomeadamente na MT e PVP/CS e controlo de células (em DMEM e HA), indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].

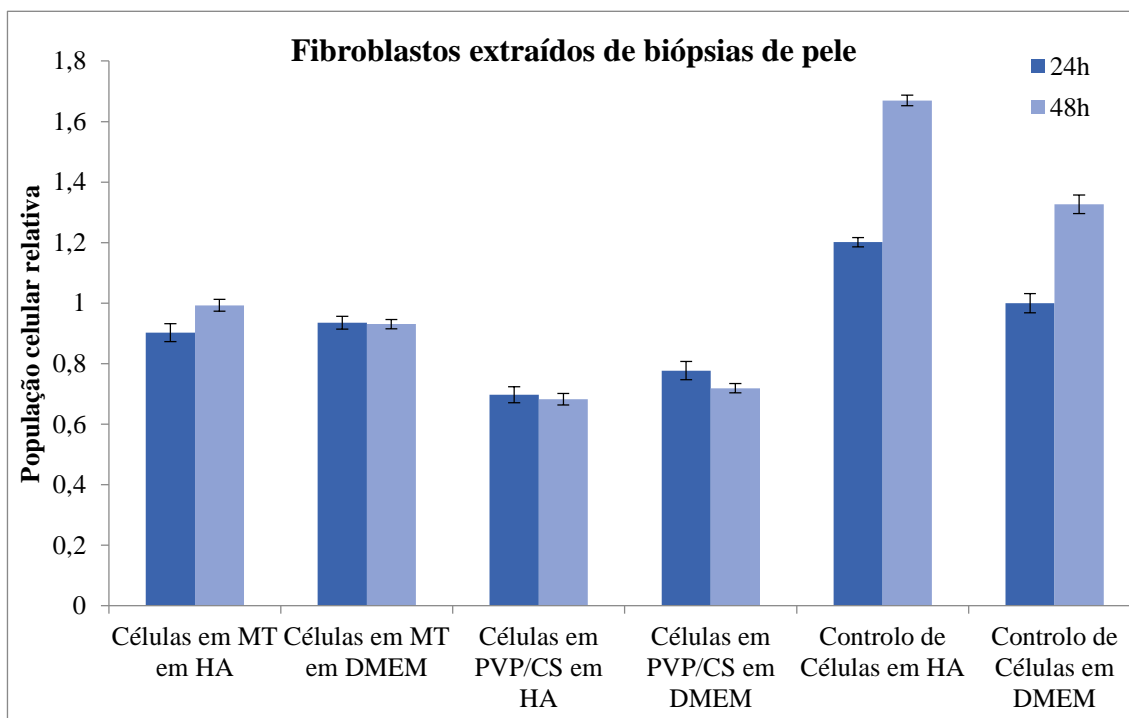


Figura 3.22 - Representação gráfica da população celular relativa dos fibroblastos extraídos de biópsias de pele humana nas diferentes condições de cultura. Células semeadas em DMEM e HA, nos diferentes materiais, nomeadamente na MT e PVP/CS e controlo de células (em DMEM e HA), indicando as taxas de adesão e proliferação. As barras verticais representam o intervalo [valor médio \pm incerteza].

Através da análise dos dois gráficos anteriores, é possível aferir que ambas as culturas, de HFFF2 e fibroblastos extraídos de explantes, apresentam a mesma tendência de crescimento. No entanto, os resultados indicam que os fibroblastos extraídos de biópsias de pele têm maior afinidade com ácido hialurónico do que as HFFF2. Além disso, na generalidade, as células provenientes dos explantes apresentaram taxas de adesão e de proliferação superiores. Este resultado, sendo estatisticamente significativo, possivelmente sugere um efeito favorável, dado que estas células apresentam respostas biológicas mais próximas do *in vivo* do que as HFFF2.

As células quando são semeadas na MT, têm taxas de adesão e proliferação mais elevadas do que quando são semeadas sobre o substrato PVP/CS. As células HFFF2 semeadas na MT apresentam uma taxa de adesão de 66,4%, 25,5% menos do que os fibroblastos provenientes do explante. Quando as células são semeadas sobre a matriz de PVP/CS, a adesão diminuiu bastante. A taxa de adesão no PVP/CS foi de 52,1% e 73,7% para as HFFF2 e células extraídas de biópsias de pele, respetivamente.

A menor adesão e proliferação das células nas matrizes de PVP/CS não revela um aspeto negativo para a concretização deste trabalho, antes pelo contrário, dado que o objetivo desta camada é apenas simular um efeito protetor da epiderme, impedindo ações microbianas.

Não existem grandes alterações quando o meio de cultura é alterado, o que é um aspeto satisfatório, indicando que as células não alteram significativamente o seu comportamento quando se encontram embebidas no ácido hialurónico.

A determinação das taxas de adesão e proliferação celular é conseguida através do teste de viabilidade celular com a adição de resazurina. No entanto, como a cultura em bicamada consiste em duas matrizes, em que entre elas se encontram as células embebidas nos diferentes meios (DMEM e HA), não é possível realizar este tipo de teste. Efetuar o teste da resazurina nestas condições necessitaria de remover a matriz superior, o que levaria à alteração do comportamento das células. E uma difusão eficiente da resazurina até alcançar as células poderia não ser conseguida.

De qualquer modo, como o crucial é verificar a presença ou não das células nas diferentes matrizes nas diferentes condições, apenas se procedeu à visualização das células por microscopia de fluorescência. Dado que se realizaram os testes de viabilidade celular na cultura em monocamada, com as mesmas matrizes (MT e PVP/CS), consegue-se aferir *à priori* como ocorre o crescimento celular nas mesmas condições em bicamada.

3.3.2.1.1 Microscopia de fluorescência

O principal objetivo das culturas em bicamada é aferir relativamente à densidade da população celular nas diferentes matrizes (matriz inferior e superior) nas diferentes condições (Figuras 3.23, 3.24, 3.25 e 3.26), daí ter-se procedido à visualização das mesmas por microscopia de fluorescência.

A observação do citoesqueleto não foi conseguida nas matrizes ternária e PVP/CS, devido à autofluorescência da gelatina e do PVP, criando-se um campo de fundo que impossibilita a visualização. Deste modo, apenas se observaram os núcleos das células semeadas nos diferentes materiais.

Ao fim de 4 dias de cultura, as amostras foram visualizadas nos diferentes materiais, recorrendo-se ao protocolo de fixação celular e posterior marcação dos núcleos e citoesqueletos das células (em Anexo).

Nota: A cor das imagens de fluorescência nas figuras seguintes, não representam a cor real dos fluoróforos. Houve manipulação da cor, de modo a melhorar a visualização dos núcleos.

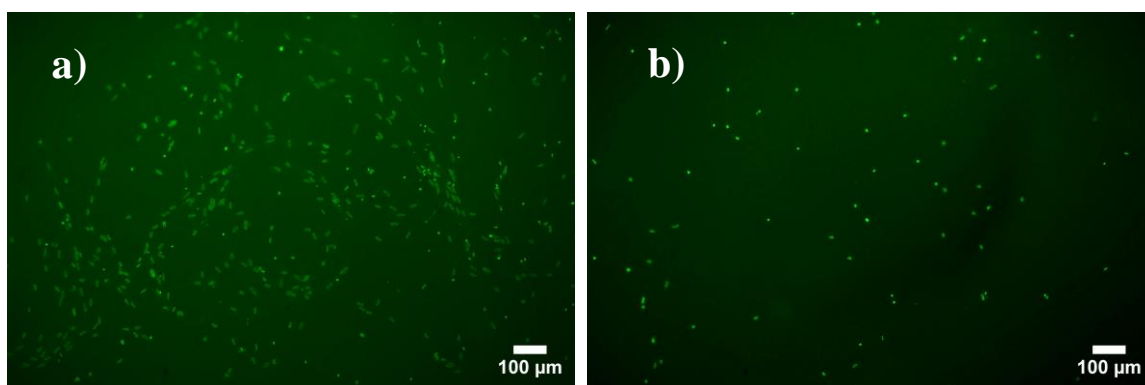


Figura 3.23 - Imagens de microscopia de fluorescência das células HFFF2 semeadas entre matrizes ternárias (GEL/PCL/CS) em DMEM. a) células aderidas à matriz inferior; b) células aderidas à matriz superior.

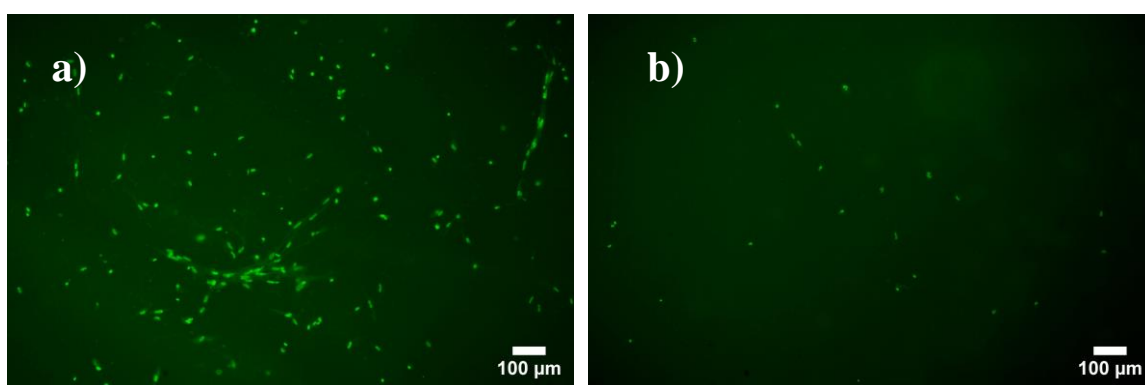


Figura 3.24 - Imagens de microscopia de fluorescência das células HFFF2 semeadas entre matrizes ternárias (GEL/PCL/CS) em HA. a) células aderidas à matriz inferior; b) células aderidas à matriz superior.

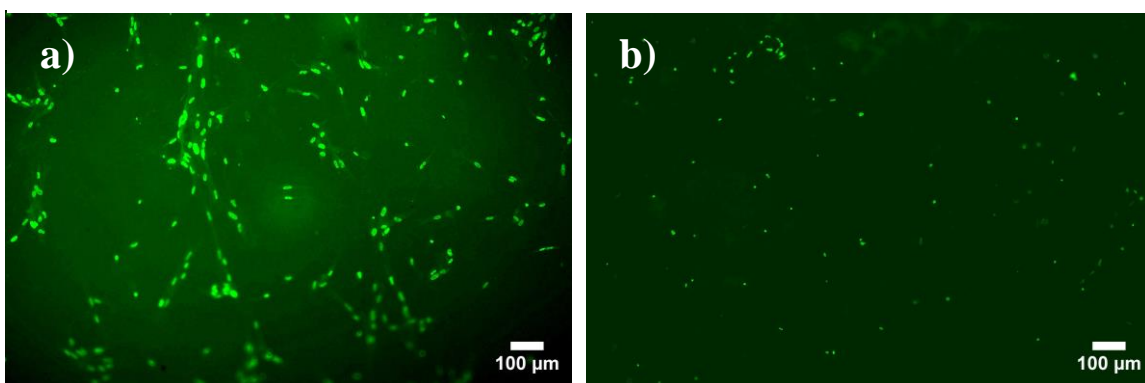


Figura 3.25 - Imagens de microscopia de fluorescência das células HFFF2 semeadas em DMEM entre uma a) matriz inferior (MT) e uma b) matriz superior (PVP/CS).

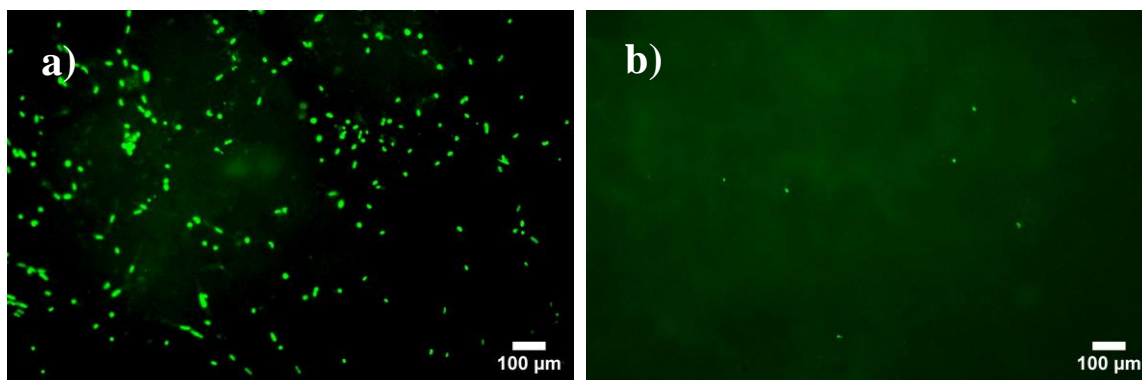


Figura 3.26 - Imagens de microscopia de fluorescência das células HFFF2 semeadas em HA entre uma a) matriz inferior (MT) e uma b) matriz superior (PVP/CS).

Comparando qualitativamente as imagens de microscopia de fluorescência entre as células semeadas em HA e em DMEM, constatou-se que não existem grandes discrepâncias a nível de densidade celular. No entanto, analisando as imagens obtidas nas figuras anteriores é possível constatar que em ambas as condições de cultura, a matriz inferior (MT) possui uma população celular substancialmente mais elevada do que na matriz superior (MT ou PVP/CS). Esta tendência é justificada pelo facto das células sedimentarem e aderirem à matriz inferior. Este é o comportamento esperado, dado que o objetivo deste trabalho é desenvolver um substituto dérmico constituído por uma matriz ternária (GEL/PCL/CS), onde existe adesão e proliferação celular, de modo a auxiliar na regeneração da pele. O substituto epidérmico desenvolvido com PVP e CS tem como função simular um efeito protetor da epiderme com ações antimicrobianas, logo a adesão e proliferação celular nesta matriz não é uma condição necessária.

Os testes *in vitro* com culturas em bicamada foram realizados com a MT também como matriz superior, para que haja um termo de comparação com a matriz PVP/CS, de modo a constatar se de facto é na matriz inferior em que ocorre uma maior adesão e proliferação celular.

Nas Figuras 3.22 e 3.23 é possível observar alguns aglomerados celulares, devendo-se talvez à dificuldade de homogeneização da suspensão celular (após a tripsinização), que se encontrava com uma confluência bastante elevada.

Na matriz superior, os núcleos apresentam uma morfologia mais arredondada, talvez porque quando se separou manualmente as camadas inferior e superior, os núcleos tenham alterado a sua morfologia, causando eventualmente uma rutura dos mesmos.

4 Conclusões e Perspetivas Futuras

O principal objetivo desta tese consistia no desenvolvimento de um substituto dérmico baseado em polímeros biodegradáveis e biocompatíveis e células autólogas, obtidas a partir de biópsias de pele, destinado a queimaduras profundas. Para além de um substituto dérmico pretendia-se desenvolver um substituto epidérmico. O projeto integrava a utilização do ácido hialurónico como veículo de entrega das células na ferida. Deste modo, tencionava-se avaliar a viabilidade deste gel através de testes *in vitro*, com a linha celular HFFF2 e células obtidas a partir de biópsias de pele, embebidas no HA sobre as matrizes produzidas por eletrofiação. Foram desenvolvidas matrizes de diferentes composições: matrizes unitárias (GEL, PCL e CS), matrizes binárias como substituto epidérmico (PVP/CS) e matrizes ternárias como substituto dérmico (MT ou GEL/PCL/CS).

Quanto às fibras submicrométricas produzidas, apresentavam diâmetros médios e morfologias discrepantes entre si. A GEL reticulada apresentou fusão parcial das fibras, indicando alteração morfológica devido à exposição ao vapor de água da solução de GTA. A MT reticulada não apresentou fusão mas verificou-se um aumento do diâmetro médio das fibras reticuladas. Quanto às matrizes de PVP/CS, verificou-se um maior diâmetro médio nas matrizes com 60 minutos de irradiação.

De modo a tornar insolúvel a fração solúvel presente dos substitutos dérmico e epidérmico, efetuaram-se testes de reticulação para cada substituto. Através dos testes de perda de massa da matriz PVP/CS irradiada por luz UV a diferentes tempos (0, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 420 e 600 minutos), foram seleccionados os 60 minutos de irradiação. Para tempos inferiores verificou-se uma reticulação insuficiente e para tempos superiores verificou-se um aumento da perda de massa e consequentemente a degradação das amostras. Quanto à matriz ternária, efetuaram-se testes *in vitro* com as matrizes reticuladas com diferentes concentrações de GTA, nomeadamente a 5% e 50%. Constatou-se que existe uma melhor adesão e proliferação celular com o GTA com a menor concentração. De modo a remover o excesso de GTA que ficou retido nas amostras, estas foram emergidas numa solução de glicina (100 mg/ml).

No que diz respeito às propriedades físico-químicas das matrizes ternária e binária (PVP/CS), efetuaram-se testes de taxa de transmissão de vapor de água para caraterizar a que taxa a água é transmitida a partir do leito da ferida para o ambiente externo, através das membranas. Dado que a pele alcança valores compreendidos entre $278 \pm 26 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ para queimadu-

ras de 1º grau e 5138 ± 202 g/m²/dia para queimaduras mais profundas, ambas as matrizes apresentaram valores que indicaram ser aplicáveis a feridas profundas, nomeadamente 1873 ± 320 g/m²/dia e $1721 \pm 216,5$ g/m²/dia para o substituto dérmico (MT) e substituto epidérmico (PVP/CS), respetivamente.

Relativamente às propriedades mecânicas, procedeu-se ao cálculo do módulo de Young das matrizes MT e PVP/CS. Ambas as matrizes secas exibiram propriedades intermédias, ou seja, um módulo de elasticidade $E=75 \pm 7$ MPa e $E=72 \pm 15$ MPa, para a MT e PVP, respetivamente. Quando as matrizes foram hidratadas, o seu módulo de Young decresce substancialmente, indicando uma alta elasticidade e baixa rigidez dos materiais.

A análise por FTIR das matrizes de PVP/CS permitiu aferir quanto à estrutura química quando são reticuladas a diferentes tempos de irradiação. Aparentemente, o tempo de irradiação em nada influenciou a composição química. No entanto, o contrário deveria acontecer, dado que tornar as matrizes insolúveis implicaria a formação de novas ligações covalentes. Assim, significa que a irradiação apenas deu origem a ligações do mesmo tipo das já existentes.

O DSC permitiria determinar quais os pontos de fusão e de transição vítrea quando a solução polimérica, que é composta por vários polímeros, e aferir se existiam alterações nestes valores, comparando-os com os valores obtidos pelos materiais individuais. No entanto não foi possível recolher esses valores, pois a entrega por parte do serviço externo (CENIMAT/I3N) atrasou-se.

De modo a avaliar a viabilidade do ácido hialurónico como veículo de entrega de células autólogas em substitutos de pele, efetuaram-se testes *in vitro*. Inicialmente utilizou-se a linha celular HFFF2, semeando as células sob o HA e embebidas no HA diretamente nos poços de poliestireno, e concluiu-se que aderiram e proliferaram a taxas idênticas nas diferentes condições. É importante referir a dificuldade de homogeneizar a mistura de HA, por ser um gel viscoso. De modo a combater este contratempo, que poderá afetar os testes *in vitro*, seria pertinente conseguir retirar todo o HA presente nos poços de cultura para efetuar uma correta homogeneização.

Após terem-se obtido resultados animadores relativamente à sementeira em HA e estudado quais as condições ideais de reticulação, efetuaram-se testes com as células semeadas sobre os diferentes materiais (MT, GEL, PCL e CS) embebidas no HA e em DMEM, comparando-se assim o comportamento celular sob as diferentes condições de cultura. Constatou-se que as células aderiram e proliferaram em todos os substratos, embora a taxas díspares. Houve uma maior adesão e proliferação celular quando as HFFF2 são semeadas em DMEM do que em HA. Comparando o comportamento celular nos diferentes substratos, pode-se evidenciar que o subs-

trato que mais potencializa a proliferação é a GEL, seguida da MT, o PCL e por fim o CS. De seguida visualizaram-se as células HFFF2 por microscopia de fluorescência, onde se verificou maior densidade celular às 48h comparativamente às 24h, o que é de esperar dado que neste intervalo ocorre proliferação celular. Quanto à morfologia constatou-se que as células exibem uma forma fusiforme e alongada, típica dos fibroblastos.

A extração de células de biópsias de pele não foi conseguida através de métodos enzimáticos. Deste modo, procedeu-se ao seu isolamento através de explantes. Futuramente, poder-se-á encontrar soluções para utilizar métodos enzimáticos, tentando recorrendo a outras enzimas ou outras concentrações das enzimas que foram utilizadas.

Nos testes *in vitro* na MT e PVP/CS, verificou-se que as células aderiram e proliferaram com taxas superiores na MT do que no PVP/CS. Não se evidenciaram discrepâncias significativas quando as células foram semeadas nos diferentes meios de cultura (HA e DMEM). Na generalidade, as células provenientes dos explantes apresentaram taxas de adesão e de proliferação superiores. Através da análise por microscopia de fluorescência das camadas superior e inferior, concluiu-se que existe uma maior densidade celular na matriz inferior e de preferência na MT. Os núcleos apresentaram-se mais arredondados na matriz superior. Este fenómeno pode-se dever à separação manual das matrizes, levando ao rompimento dos núcleos.

Para um futuro estudo mais pormenorizado da densidade e morfologia das células entre as duas camadas, poderia-se recorrer a alternativas tais como histologia e microscopia confocal.

Seria pertinente também desenvolver testes *in vivo* em ratos de modo a sustentar mais informações para avaliar a eficácia e segurança do substituto antes de avançar para os ensaios clínicos em humanos.

Para além disto, futuramente seria interessante incorporar um agente antimicrobiano na componente epidérmica, como por exemplo, nanopartículas de prata, que revelam excelentes propriedades antimicrobianas.

De modo a aferir relativamente à durabilidade de ambas as componentes dérmica e epidérmica, poder-se-ia realizar testes de degradação com recurso a enzimas.

Referências

- [1] K. L. Kiong, S. J. Chong, and B. K. Tan, “Biobrane for burns of the ear – A novel technique,” *Burns*, vol. 41, no. 2, p. 414, 2015.
- [2] A. S. Halim, T. L. Khoo, and S. J. Mohd Yussof, “Biologic and synthetic skin substitutes: An overview.,” *Indian J. Plast. Surg.*, vol. 43, no. Suppl, pp. S23–S28, 2010.
- [3] S. R. Gomes, G. Rodrigues, G. G. Martins, M. A. Roberto, M. Mafra, C. M. R. Henriques, and J. C. Silva, “In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 46, pp. 348–358, 2015.
- [4] L. Weber, E. Kirsch, P. Müller, and T. Krieg, “Collagen type distribution and macromolecular organization of connective tissue in different layers of human skin.,” *The Journal of investigative dermatology*, vol. 82, no. 2, pp. 156–60, 1984.
- [5] A. D. Metcalfe and M. W. J. Ferguson, “Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 34, pp. 5100–5113, 2007.
- [6] R. K. Freinkel and D. T. Woodley, *The Biology of the Skin*. The Parthenon Publishing Group, 2001.
- [7] G. K. Menon, “New insights into skin structure: Scratching the surface,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. SUPPL. 1, pp. S3–S17, 2002.
- [8] E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, B. H. Bay, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, “Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution,” *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 3 SPEC. ISS., pp. 321–330, 2007.
- [9] L. M. Mikesch, L. R. Aramadhaka, C. Moskaluk, P. Zigrino, C. Mauch, and J. W. Fox, “Proteomic anatomy of human skin,” *J. Proteomics*, vol. 84, pp. 190–200, 2013.
- [10] S. MacNeil, “Progress and opportunities for tissue-engineered skin,” *Nature*, vol. 445, no. 7130, pp. 874–880, 2007.

- [11] T. Hirobe, "Keratinocytes regulate the function of melanocytes," *Dermatologica Sin.*, vol. 32, no. 4, pp. 10–14, 2014.
- [12] J. Seneschal, R. A. Clark, A. Gehad, C. M. Baecher-Allan, and T. S. Kupper, "Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells," *Immunity*, vol. 36, no. 5, pp. 873–884, 2012.
- [13] I. Moll, M. Roessler, J. M. Brandner, A. C. Eispert, P. Houdek, and R. Moll, "Human Merkel cells - Aspects of cell biology, distribution and functions," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 84, no. 2–3, pp. 259–271, 2005.
- [14] C. H. Daly, "Biomechanical properties of dermis.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 79 Suppl 1, p. 17s–20s, 1982.
- [15] M. Ventre, F. Mollica, and P. a Netti, "The effect of composition and microstructure on the viscoelastic properties of dermis.," *J. Biomech.*, vol. 42, no. 4, pp. 430–5, 2009.
- [16] I. A. Darby, B. Laverdet, F. Bonté, and A. Desmoulière, "Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing.," *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, vol. 7, pp. 301–11, 2014.
- [17] R. F. Diegelmann and M. C. Evans, "Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.," *Front. Biosci.*, vol. 9, no. 4, pp. 283–289, 2004.
- [18] S. Enoch and D. J. Leaper, "Basic science of wound healing," *Surg.*, vol. 23, no. 2, pp. 37–42, 2005.
- [19] D. Harper, A. Young, and C.-E. McNaught, "The physiology of wound healing," *Surg.*, vol. 32, no. 9, pp. 445–450, 2014.
- [20] T. Velnar, T. Bailey, and V. Smrkolj, "The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms.," *J. Int. Med. Res.*, vol. 37, no. 5, pp. 1528–1542, 2009.
- [21] J. Li, J. Chen, and R. Kirsner, "Pathophysiology of acute wound healing," *Clin. Dermatol.*, vol. 25, no. 1, pp. 9–18, 2007.
- [22] B. S. Atiyeh, S. N. Hayek, and S. W. Gunn, "New technologies for burn wound closure and healing - Review of the literature," *Burns*, vol. 31, no. 8, pp. 944–956, 2005.

- [23] E. Ortiz-prado, L. Armijos, and A. Lucia, "ScienceDirect A population-based study of the epidemiology of acute adult burns in Ecuador from 2005 to 2014," *Burns*, vol. 41, no. 3, pp. 4–11, 2014.
- [24] R. X. Xu and X. Sun, *Burns Regenerative Medicine and Therapy*. 2004.
- [25] M. Held, a. Rahmanian-Schwarz, J. Rothenberger, J. Schiefer, B. Janghorban Esfahani, H. E. Schaller, and P. Jaminet, "Alteration of biomechanical properties of burned skin," *Burns*, vol. 41, no. 4, pp. 789–795, 2015.
- [26] I. Jones, L. Currie, and R. Martin, "A guide to biological skin substitutes.," *Br. J. Plast. Surg.*, vol. 55, no. 3, pp. 185–193, 2002.
- [27] M. Balasubramani, T. R. Kumar, and M. Babu, "Skin substitutes: a review," *Burns*, vol. 27, no. 5, pp. 534–544, 2001.
- [28] G.-Y. Hur, D.-K. Seo, and J.-W. Lee, "Contracture of skin graft in human burns: Effect of artificial dermis.," *Burns*, vol. 40, no. 8, pp. 1497–503, 2014.
- [29] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, "Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing," *Int. J. Pharm.*, vol. 463, no. 2, pp. 127–136, 2014.
- [30] J. Vacanti, "Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art.," *J. Pediatr. Surg.*, vol. 45, no. 2, pp. 291–4, 2010.
- [31] R. A. Kamel, J. F. Ong, E. Eriksson, J. P. E. Junker, and E. J. Caterson, "Tissue Engineering of Skin," *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 217, no. 3, pp. 533–555, 2013.
- [32] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 944, pp. 62–73, 2001.
- [33] Alrubaiy, "Skin Substitutes: A Brief Review of Types and Clinical Applications," *Oman Med. J.*, vol. 24, no. 1, pp. 6–8, 2009.
- [34] L. Vandam and B. Covino, "Tribute to the Vacantis," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 10, no. 1, pp. 4–6, 2006.
- [35] S. F. Badylak and R. M. Nerem, "Progress in tissue engineering and regenerative

- medicine.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 8, pp. 3285–3286, 2010.
- [36] R. M. Nerem, “Tissue engineering: the hope, the hype, and the future.,” *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 5, pp. 1143–50, 2006.
 - [37] M. Ferreira, A. Paggiaro, C. Issac, N. Neto, and G. Santis, “Skin substitutes : current concepts and a new classification system,” vol. 26, no. 4, pp. 696–702, 2011.
 - [38] P. Kumar, “Classification of skin substitutes.,” *Burns*, vol. 34, no. 1, pp. 148–9, 2008.
 - [39] H. Debels, M. Hamdi, K. Abberton, and W. Morrison, “Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options.,” *Plast. Reconstr. surgery. Glob. open*, vol. 3, no. 1, p. e284, 2015.
 - [40] S. Mehta, *Commercializing Successful Biomedical Technologies*, vol. 14, no. 4. 2008.
 - [41] D. T. Rovee and H. I. Maibach, *The Epidermis In Wound Healing*. 2004.
 - [42] R. J. Kumar, R. M. Kimble, R. Boots, and S. P. Pegg, “Treatment of partial-thickness burns: A prospective, randomized trial using transcyte™,” *ANZ J. Surg.*, vol. 74, no. 8, pp. 622–626, 2004.
 - [43] N. Ortega-Zilic, T. Hunziker, S. Lauchli, D. O. Mayer, C. Huber, K. Baumann Conzett, K. Sippel, L. Borradori, L. E. French, and J. Hafner, “EpiDex® swiss field trial 2004-2008,” *Dermatology*, vol. 221, no. 4, pp. 365–372, 2010.
 - [44] E. Foley, A. Robinson, and M. Maloney, “Skin Substitutes and Dermatology: A Review,” *Curr. Dermatol. Rep.*, vol. 2, no. 2, pp. 101–112, 2013.
 - [45] H. Yim, Y. S. Cho, C. H. Seo, B. C. Lee, J. H. Ko, D. Kim, J. Hur, W. Chun, and J. H. Kim, “The use of AlloDerm on major burn patients: AlloDerm prevents post-burn joint contracture,” *Burns*, vol. 36, no. 3, pp. 322–328, 2010.
 - [46] S. J. Oh and Y. Kim, “Combined AlloDerm® and thin skin grafting for the treatment of postburn dyspigmented scar contracture of the upper extremity,” *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.*, vol. 64, no. 2, pp. 229–233, 2011.
 - [47] P. Verolino, V. Casoli, D. Masia, G. Delia, C. Isacu, and J.-C. Castede, “A skin

substitute (Integra) in a successful delayed reconstruction of a severe injured hand.,” *Burns*, vol. 34, no. 2, pp. 284–7, 2008.

- [48] A. Cuadra, G. Correa, R. Roa, J. L. Piñeros, H. Norambuena, S. Searle, R. Las Heras, and W. Calderón, “Functional results of burned hands treated with Integra®.,” *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, vol. 65, no. 2, pp. 228–34, 2012.
- [49] M. Leffler, R. E. Horsch, a. Dragu, and a. D. Bach, “The use of the artificial dermis (Integra??) in combination with vacuum assisted closure for reconstruction of an extensive burn scar - A case report,” *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.*, vol. 63, no. 1, pp. e32–e35, 2010.
- [50] I. S. Whitaker, S. Worthington, S. Jivan, and a. Phipps, “The use of Biobrane?? by burn units in the United Kingdom: A national study,” *Burns*, vol. 33, no. 8, pp. 1015–1020, 2007.
- [51] Q. Frew, B. Philp, O. Shelley, S. Myers, H. Navsaria, and P. Dziewulski, “The use of Biobrane® as a delivery method for cultured epithelial autograft in burn patients.,” *Burns*, vol. 39, no. 5, pp. 876–80, 2013.
- [52] S. MacNeil, “Biomaterials for tissue engineering of skin,” *Mater. Today*, vol. 11, no. 5, pp. 26–35, 2008.
- [53] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, “Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review,” *J. Control. Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, 2012.
- [54] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, “The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, 2010.
- [55] R. J. Wade and J. a. Burdick, “Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly,” *Nano Today*, vol. 9, no. 6, pp. 722–742, 2014.
- [56] A. A. Karim and R. Bhat, “Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins,” *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 3, pp. 563–576, 2009.
- [57] M. C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M. E. López-Caballero, and M. P. Montero, “Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A

review,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 8, pp. 1813–1827, 2011.

- [58] M. C. Gómez-Guillén, M. Pérez-Mateos, J. Gómez-Estaca, E. López-Caballero, B. Giménez, and P. Montero, “Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 20, no. 1, pp. 3–16, 2009.
- [59] B. E. Abdelmalek, J. Gómez-Estaca, A. Sila, O. Martinez-Alvarez, M. C. Gómez-Guillén, S. Chaabouni-Ellouz, M. A. Ayadi, and A. Bougatef, “Characteristics and functional properties of gelatin extracted from squid (*Loligo vulgaris*) skin,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 65, pp. 924–931, 2016.
- [60] M. Rinaudo, “Chitin and chitosan: Properties and applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006.
- [61] C. K. S. Pillai, W. Paul, and C. P. Sharma, “Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 34, no. 7, pp. 641–678, 2009.
- [62] I.-Y. Kim, S.-J. Seo, H.-S. Moon, M.-K. Yoo, I.-Y. Park, B.-C. Kim, and C.-S. Cho, “Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–21, 2008.
- [63] B. Veleirinho, D. S. Coelho, P. F. Dias, M. Maraschin, R. M. Ribeiro-do-Valle, and J. a. Lopes-da-Silva, “Nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, no. 4, pp. 343–350, 2012.
- [64] P. a. Gunatillake, R. Adhikari, and N. Gadegaard, “Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, pp. 1–16, 2003.
- [65] S. Eshraghi and S. Das, “Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2467–2476, 2010.
- [66] C. M. Agrawal and R. B. Ray, “Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering,” 2000.
- [67] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, and P. Wang, “The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 9, pp. 1735–1740, 2006.

- [68] T. Prasad, E. a. Shabeena, D. Vinod, T. V. Kumary, and P. R. Anil Kumar, "Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 1, 2015.
- [69] C. Bordes, V. Fréville, E. Ruffin, P. Marote, J. Y. Gauvrit, S. Briançon, and P. Lantéri, "Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process," *Int. J. Pharm.*, vol. 383, no. 1–2, pp. 236–243, 2010.
- [70] M. N. Collins and C. Birkinshaw, "Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 92, no. 2, pp. 1262–1279, 2013.
- [71] C. Henriques, R. Vidinha, D. Botequim, J. P. Borges, and J. a M. C. Silva, "A systematic study of solution and processing parameters on nanofiber morphology using a new electrospinning apparatus.," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 6, pp. 3535–3545, 2009.
- [72] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [73] N. Okutan, P. Terzi, and F. Altay, "Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers," *Food Hydrocoll.*, vol. 39, pp. 19–26, 2014.
- [74] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008.
- [75] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review.," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 5, pp. 1197–211, 2006.
- [76] M. Kong, X. G. Chen, K. Xing, and H. J. Park, "Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 144, no. 1, pp. 51–63, 2010.
- [77] H. Banwell, "What is the evidence for tissue regeneration impairment when using a formulation of PVP-I antiseptic on open wounds?," *Dermatology*, vol. 212, no. SUPPL. 1, pp. 66–76, 2006.
- [78] W. Lu, M. Ma, H. Xu, B. Zhang, X. Cao, and Y. Guo, "Gelatin nano fi bers prepared by

- spiral-electrospinning and cross-linked by vapor and liquid-phase glutaraldehyde,” *Mater. Lett.*, vol. 140, pp. 1–4, 2015.
- [79] a. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini, and N. Roveri, “Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 8, pp. 763–768, 2001.
 - [80] R. . de Carvalho and C. R. . Grosso, “Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde,” *Food Hydrocoll.*, vol. 18, no. 5, pp. 717–726, 2004.
 - [81] P. M. a Alves, R. a. Carvalho, I. C. F. Moraes, C. G. Luciano, a. M. Q. B. Bittante, and P. J. a Sobral, “Development of films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol) cross linked with glutaraldehyde,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 7, pp. 1751–1757, 2011.
 - [82] W. Wang, X. Jin, Y. Zhu, C. Zhu, J. Yang, H. Wang, and T. Lin, “Effect of vapor-phase glutaraldehyde crosslinking on electrospun starch fibers,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 140, pp. 356–361, 2016.
 - [83] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, and K. C. Waldron, “Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking,” *Biotechniques*, vol. 37, no. 5, pp. 790–802, 2004.
 - [84] A. Sionkowska, M. Wisniewski, J. Skopinska, S. Vicini, and E. Marsano, “The influence of UV irradiation on the mechanical properties of chitosan/poly(vinyl pyrrolidone) blends,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 88, no. 2, pp. 261–267, 2005.
 - [85] S. R. Gomes, “Desenvolvimento de matrizes biomiméticas como substitutos de pele destinados ao tratamento de queimaduras,” 2013.
 - [86] P. Gill, T. T. Moghadam, and B. Ranjbar, “Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience.,” *J. Biomol. Tech.*, vol. 21, no. 4, pp. 167–93, 2010.
 - [87] R. Machado, A. da Costa, V. Sencadas, C. Garcia-Arévalo, C. M. Costa, J. Padrão, A. Gomes, S. Lanceros-Méndez, J. C. Rodríguez-Cabello, and M. Casal, “Electrospun silk-elastin-like fibre mats for tissue engineering applications.,” *Biomed. Mater.*, vol. 8, no. 6, p. 065009, 2013.
 - [88] Sigma-Aldrich Co, “Cell Types & Culture Characteristics,” *Fundamental Techniques in*

- Cell Culture Laboratory Handbook*, 2010. [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-types-culture.html>. [Accessed: 12-Sep-2016].
- [89] Thermo Fisher Scientific Inc, "Introduction to Cell Culture," 2015. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>. [Accessed: 12-Sep-2016].
- [90] J. R. Venugopal, Y. Zhang, and S. Ramakrishna, "In Vitro Culture of Human Dermal Fibroblasts on Electrospun Polycaprolactone Collagen Nano fibrous Membrane," *Artif. Organs*, vol. 30, no. 6, pp. 440–446, 2006.
- [91] S. Llames, E. García, V. García, M. del Río, F. Larcher, J. L. Jorcano, E. López, P. Holguín, F. Miralles, J. Otero, and A. Meana, "Clinical results of an autologous engineered skin," *Cell Tissue Bank.*, vol. 7, no. 1, pp. 47–53, 2006.
- [92] S. Hybbinette, M. Boström, and K. Lindberg, "Enzymatic dissociation of keratinocytes from human skin biopsies for in vitro cell propagation.,", *Exp. Dermatol.*, vol. 8, no. 1, pp. 30–38, 1999.
- [93] C. Tonda-Turo, P. Gentile, S. Saracino, V. Chiono, V. K. Nandagiri, G. Muzio, R. A. Canuto, and G. Ciardelli, "Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agent," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 49, no. 4, pp. 700–706, 2011.
- [94] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z. M. Huang, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, "Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers," *Polymer (Guildf.)*, vol. 47, no. 8, pp. 2911–2917, 2006.
- [95] Y. Pranoto, C. M. Lee, and H. J. Park, "Characterizations of fish gelatin films added with gellan and ??-carrageenan," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 40, no. 5, pp. 766–774, 2007.
- [96] E. M. Abdelrazek, H. M. Ragab, and M. Abdelaziz, "Physical Characterization of Poly (vinyl pyrrolidone) and Gelatin Blend Films Doped," *Plast. Polym. Technol.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–8, 2013.
- [97] H. Kweon, M. K. Yoo, I. K. Park, T. H. Kim, H. C. Lee, H. S. Lee, J. S. Oh, T. Akaike, and C. S. Cho, "A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 5, pp. 801–808, 2003.

- [98] F. L. Mi, S. S. Shyu, Y. B. Wu, S. T. Lee, J. Y. Shyong, and R. N. Huang, "Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing," *Biomaterials*, vol. 22, no. 2, pp. 165–173, 2001.
- [99] S. R. Gomes, G. Rodrigues, G. G. Martins, C. M. R. Henriques, and J. C. Silva, "In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 3, pp. 1219–1227, 2013.
- [100] A. Sionkowska, H. Kaczmarek, M. Wisniewski, J. Skopinska, S. Lazare, and V. Tokarev, "The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films," *Surf. Sci.*, vol. 600, no. 18, pp. 3775–3779, 2006.

Anexos

Descongelamento das células HFFF2

1. Descongelar o criotubo, que se encontra na arca congeladora, contendo 1 ml da linha celular, em banho maria a 37°C;
2. Colocar as células num tubo de falcon e adicionar 4 ml de meio DMEM fresco e resuspending a mistura;
3. Centrifugar a suspensão durante 5 minutos a 150g
4. Descartar o sobrenadante;
5. Adicionar 5 ml de meio DMEM fresco e resuspending;
6. Transferir a suspensão celular para um frasco T25 e colocá-lo na incubadora a 37°C com uma atmosfera de CO₂ a 5%.

Preparação do material antes da tripsinação

1. Lavar os copos de teflon necessários, que se encontram em banho de etanol 70% (v/v), e secá-los, aspirando o excesso de etanol;
2. Proceder às lavagens das lamelas com as fibras, começando por lavar com isopropanol, aspirando-o de seguida; lavar duas vezes com PBS⁻, removendo-o de seguida;
3. Proceder à construção da placa de 24 poços, começando por colocar os copos de teflon e depois as lamelas;
4. Lavar o material (lamelas dentro dos copos de teflon) com DMEM para remover o excesso de PBS⁻ e voltar a colocar DMEM nos poços e deixar repousar até a utilização da cultura.

Tripsinação e contagem celular

1. Aspirar o meio do frasco T25, tendo em atenção não tocar com a ponta da pipeta na camada de células;
2. Adicionar ao T25 5 ml de PBS⁻ e movimentar um pouco o frasco e dispensar;
3. Colocar 500 µl de tripsina (TrypLE) e oscilar o frasco de modo a que a tripsina cubra toda a superfície do T25 e incubar a 37°C durante 5 minutos;
4. Visualizar o T25 ao microscópio, de modo a verificar se as células aderentes se soltaram da superfície e se se encontram em suspensão e não aglomeradas;

5. Ressuspender as células e colocar a suspensão num tubo de falcon e proceder de seguida à contagem celular;
6. Para a contagem celular, preparar uma mistura num eppendorf com 50 µl de azul de tripano e 50 µl da suspensão e preencher as duas câmaras do hemocitómetro (Hirschmann) e de seguida proceder ao cálculo da concentração celular, aplicando a seguinte equação:

$$C = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número de quadrados contados com 1mm de lado}} \times 2 \times 10\,000$$

Teste de proliferação celular – Teste da resazurina

1. Adicionar ao meio presente nos poços da cultura, a solução de resazurina a 20%;
2. Homogeneizar a solução nos poços, de modo a facilitar a difusão da resazurina até às células;
3. Incubar a cultura a 37°C durante aproximadamente 4 horas;
4. Após a incubação de 4 horas, retirar 150 µl de cada amostra para um poço da placa de 96 poços;
5. Proceder à leitura de absorvâncias usando um leitor de absorvâncias (Biotek).

Fixação de células

1. Lavar as amostras com PBS⁺⁺;
2. Adicionar 250 µl de paraformaldeído (PFA) a uma concentração de 3,7% a cada amostra e deixar actuar durante 15 minutos;
3. Aspirar o PFA e lavar novamente com PBS⁺⁺ duas vezes;
4. Remover o PBS⁺⁺ e lavar com água ultrapura.

Marcação dos núcleos

1. Adicionar às amostras 50 µl de solução de DAPI a 300 nM e incubar à temperatura ambiente por 2-5 minutos;
2. Lavar as amostras com PBS⁺⁺;
3. Transferir cada amostra para uma caixa de Petri e colocar entre as células e uma lamela de vidro 10-20 µl de solução de montagem;
4. Observar ao microscópio invertido com o mínimo de luz possível na sala.

Marcação do citoesqueleto

1. Permeabilizar as células com Triton X-100 a 0,2% e deixar actuar por 5 minutos à temperatura ambiente;
2. Lavar as amostras com PBS⁺⁺;
3. Aplicar 200 µl de solução a 100 nM do Acti-stainTM 555 phalloidin e incubar protegido da luz à temperatura ambiente por 30 minutos;
4. Lavar as amostras com PBS⁺⁺;
5. Transferir cada amostra para uma caixa de Petri e colocar entre as células e uma lamela de vidro 10-20 µl de solução de montagem;
6. Observar ao microscópio invertido com o mínimo de luz na sala.

Termogramas obtidos por DSC/TGA

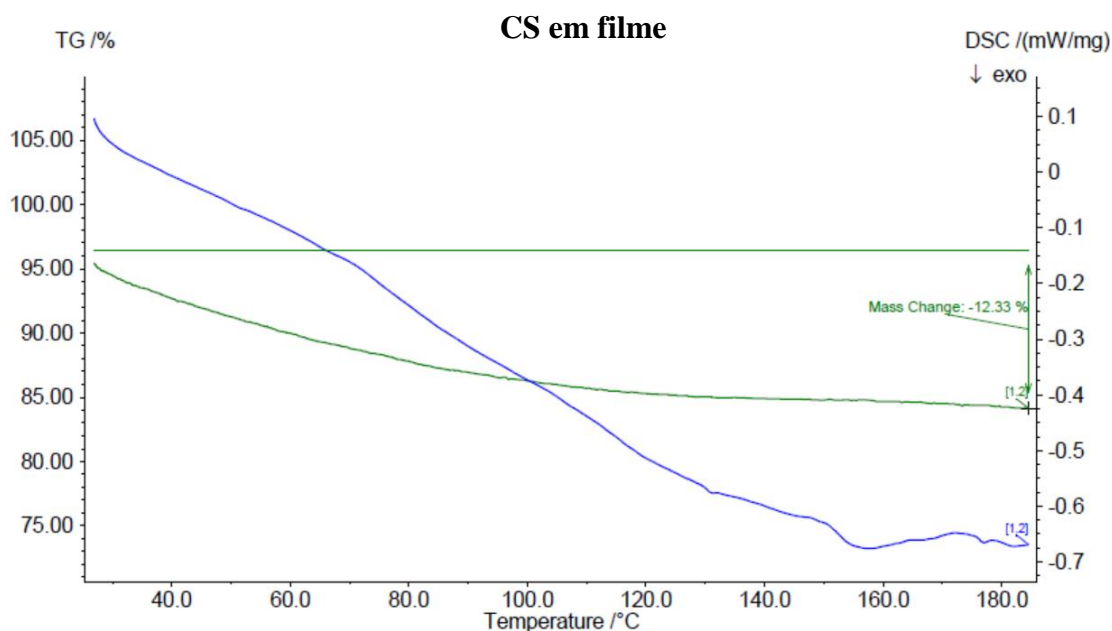


Figura 4.1 - Termograma obtido por DSC do CS puro em filme, não se evidenciando quaisquer temperaturas de fusão, desnaturação ou de transição vítrea. Verificou-se uma perda de massa cerca de 12,3% devida à perda de água adsorvida no filme.

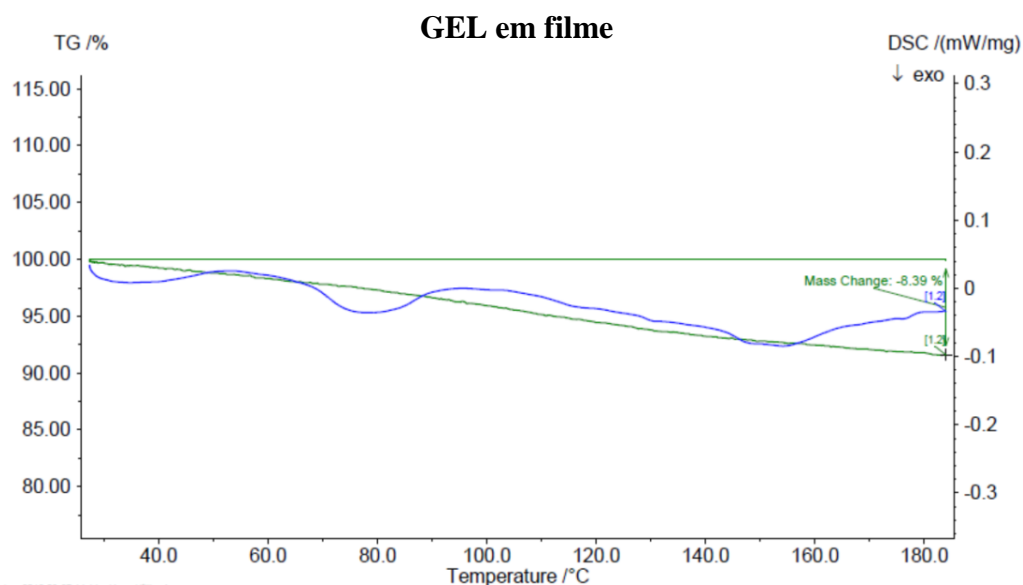


Figura 4.2 - Termograma obtido por DSC da GEL pura em filme, não se evidenciando quaisquer temperaturas de fusão, desnaturação ou de transição vítrea. Verificou-se uma perda de massa cerca de 8,4% devida à perda de água adsorvida no filme.

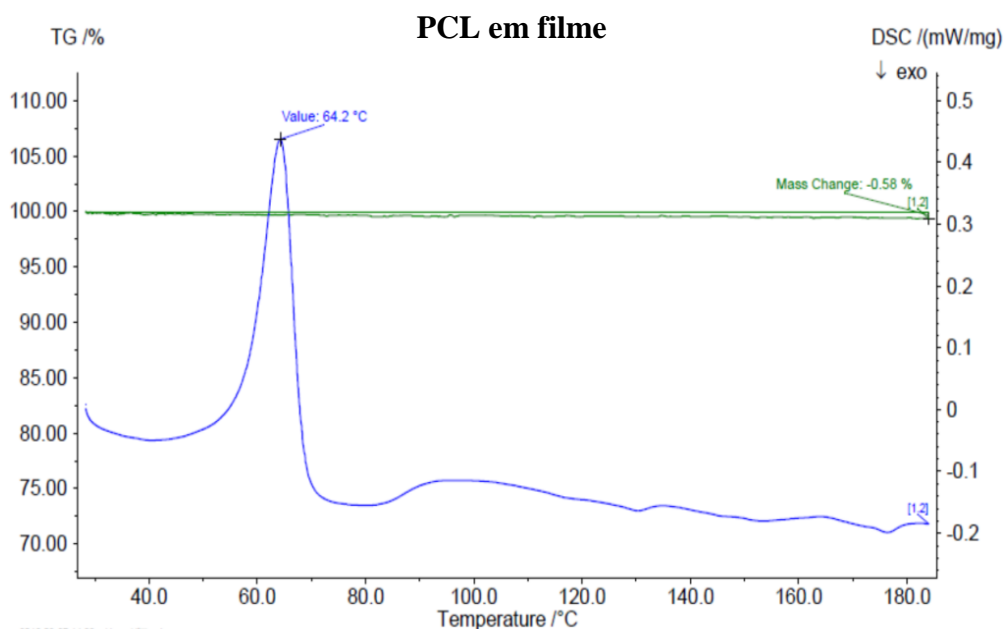


Figura 4.3 - Termograma obtido por DSC do PCL puro em filme, evidenciando-se a sua temperatura de fusão (64,2°C). Verificou-se uma perda de massa mínima, cerca de 0,58%.

PEO em filme

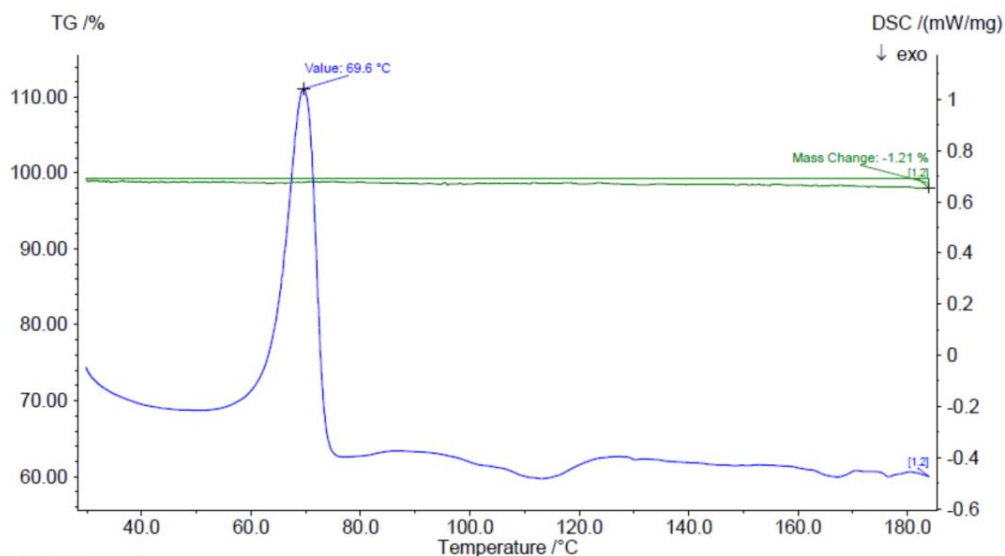


Figura 4.4 - Termograma obtido por DSC do PEO puro em filme, evidenciando-se a sua temperatura de fusão (69,6°C). Verificou-se uma perda de massa mínima, cerca de 1,21%.

PVP em filme

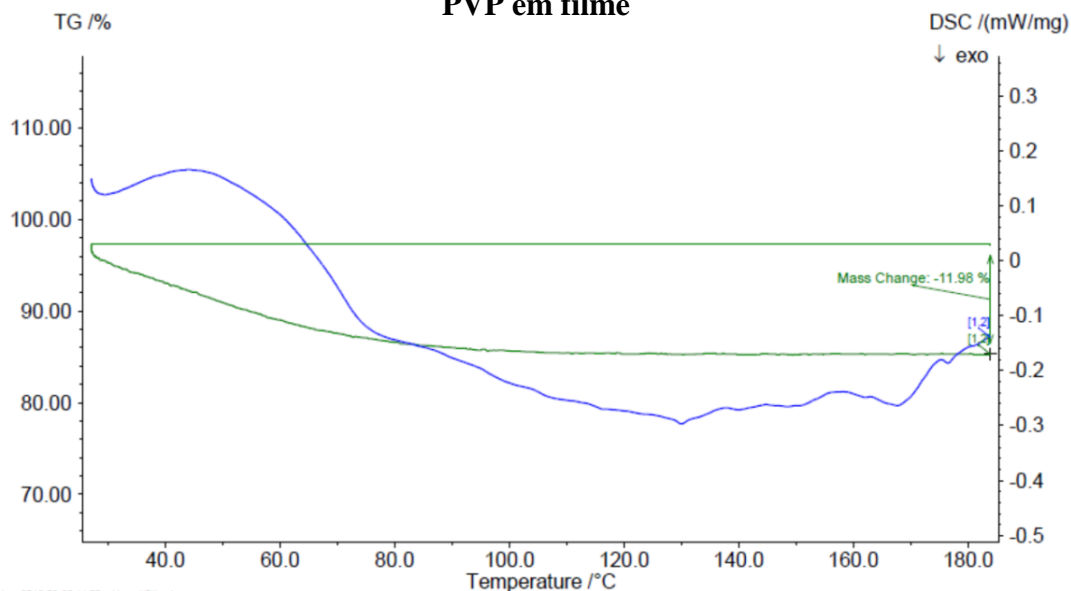


Figura 4.5 - Termograma obtido por DSC do PVP puro em filme, evidenciando-se uma curva endotérmica bastante ténue perto dos 160°C, que poderá eventualmente corresponder à temperatura de transição vítrea do PVP. Verificou-se uma perda de massa mínima de cerca de 12% devida à perda de água adsorvida no filme.

PVP/CS com 15 minutos de irradiação UV

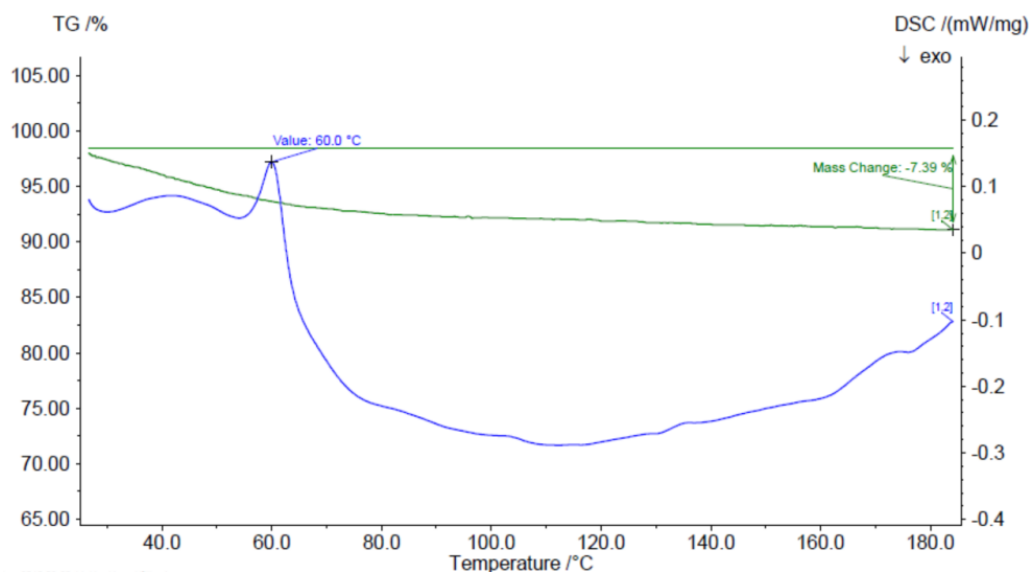


Figura 4.6 - Termograma obtido por DSC do PVP/CS irradiado 15 minutos em filme, evidenciando-se a temperatura de fusão do PEO (60,0°C). Verificou-se uma perda de massa de cerca de 7,4%.

PVP/CS com 60 minutos de irradiação UV

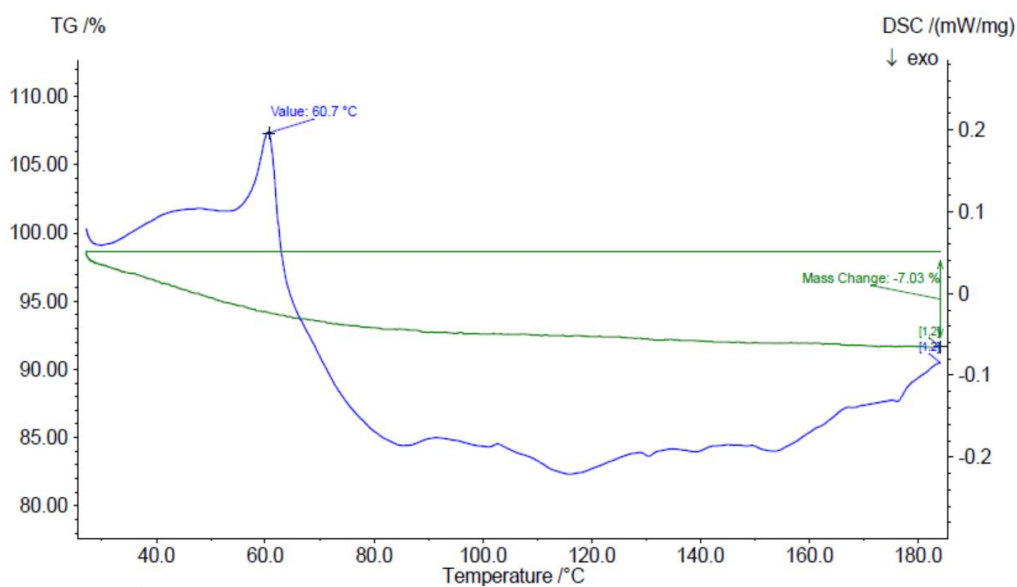


Figura 4.7 - Termograma obtido por DSC do PVP/CS irradiado 60 minutos em filme, evidenciando-se a temperatura de fusão do PEO (60,7°C). Verificou-se uma perda de massa de cerca de 7%.

PVP/CS com 600 minutos de irradiação UV

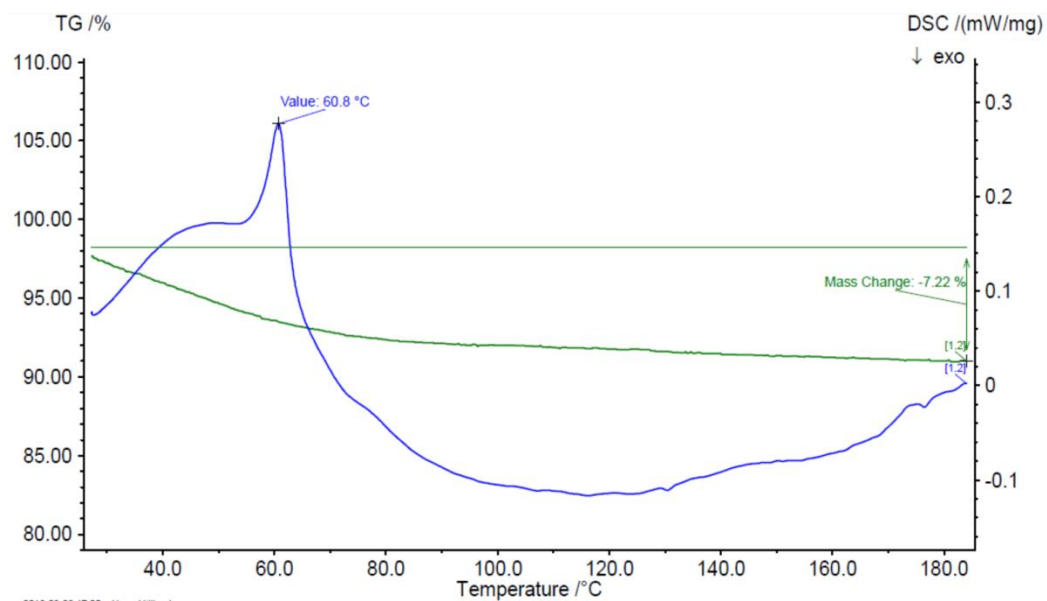


Figura 4.8 - Termograma obtido por DSC do PVP/CS irradiado 600 minutos em filme, evidenciando-se a temperatura de fusão do PEO (60,8°C). Verificou-se uma perda de massa de cerca de 7,2%.